

บทที่ 4

การวิเคราะห์การแสดงออกที่แตกต่างของยีนในเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับโลหะหนักและอนุภาคนาโนซิลเวอร์

ในปัจจุบัน มนุษย์ได้นำสารเคมีที่มีพิษทั้งหลายมาใช้ในชีวิตประจำวันมากมาย เช่นในงานเกษตรกรรม อุตสาหกรรม หรือแม้กระทั่งในครัวเรือน ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดอันตรายถึงชีวิต การเจ็บป่วยอย่างรุนแรงหรือเรื้อรังแล้วแต่กรณี และยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genetic) และความผิดปกติของร่างกายด้วย [1] สารโลหะหนัก (Heavy Metals) จำพวก อาร์เซนิก (Arsenic) แคดเมียม (Cadmium) และ โครเมียม (Chromium) ซึ่งสามารถพบได้ในยาฆ่าแมลง ยาเบื่อหนู แบตเตอรี่ พลาสติกพีวีซี เป็นต้น เป็นสารเคมีที่ถูกจัดไว้เป็นสารอันตรายอันดับต้น ๆ ที่เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมนุษย์แล้ว จะมีการสะสมและตรงเข้าทำลายเนื้อเยื่อในอวัยวะภายในที่สำคัญ โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ ทำความเสียหายต่อโครโมโซมซึ่งเป็นปัจจัยทางพันธุกรรม เป็นตัวชักนำให้เกิดมะเร็ง หรืออาจทำให้เซลล์ตาย ส่วนอนุภาคนาโนซิลเวอร์นาโน ซึ่งปัจจุบันพบได้มากขึ้นในผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภคต่าง ๆ เช่น การบรรจุหีบห่ออาหาร สิ่งทอที่ต้านทานการเกิดกลิ่น อุปกรณ์เครื่องใช้ในบ้าน และอุปกรณ์ทางการแพทย์ รวมถึงผ้าปิดแผล ในระยะเวลาไม่กี่เดือนมานี้เริ่มมีการตระหนักถึงความเสี่ยงของอนุภาคนาโนต่อการเป็นพิษต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม มีความเป็นไปได้ที่อนุภาคนาโนซิลเวอร์นาโนจะส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินและน้ำ [2] หรือทำให้แบคทีเรียที่มีโทษเกิดการต้านทานในการยับยั้งต่ออนุภาคนาโนซิลเวอร์นาโน [1]

ดังนั้นการวิจัยที่มุ่งเน้นเพื่อวิเคราะห์หาผลกระทบต่อยีน จากโลหะหนักและอนุภาคนาโนซิลเวอร์ รวมไปถึงสารผสมระหว่างโลหะหนักและอนุภาคนาโนซิลเวอร์จึงมีความสำคัญและมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากจะทำให้สามารถเข้าใจกลไกการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อได้รับสารพิษดังกล่าวข้างต้น และสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในเชิงกลไกทางด้านชีววิทยาต่อไป งานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการนำสถิติทดสอบ F_s - test มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้จากเทคนิคไมโครอาร์เรย์ของยีนในเซลล์มะเร็งตับที่ได้รับโลหะหนักและอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ซึ่งข้อมูลจากเทคนิคไมโครอาร์เรย์ดังกล่าวได้มาจากโครงการวิจัยเรื่อง Analysis of Mixture Toxicity of Dual Combinations for Silver Nanoparticles and Heavy Metals using Toxicogenomics Approach [1] โดยจะนำเสนอ

รายละเอียดข้อมูลจากงานวิจัยดังกล่าว วิธีการ/ขั้นตอนในการทดสอบ และผลการวิเคราะห์ที่ได้ตามลำดับ

4.1 ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นข้อมูลทุติยภูมิ จากงานวิจัยเรื่อง Analysis of Mixture Toxicity of Dual Combinations for Silver Nanoparticles and Heavy Metals using Toxicogenomics Approach จาก Laboratory of Water Quality Control Engineering คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย [1] ซึ่งได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารคู่ผสม 3 คู่คือ ซิลเวอร์นาโนผสมกับอาเซนิก (AgNPs-As) ซิลเวอร์นาโนผสมกับแคดเมียม (AgNPs-Cd) และซิลเวอร์นาโนผสมกับโครเมียม (AgNPs-Cr) ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยใช้ HG Focus array (8793 human genes) และ ชุดทดลองไมโครอาร์เรย์ของบริษัท Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้ คือ

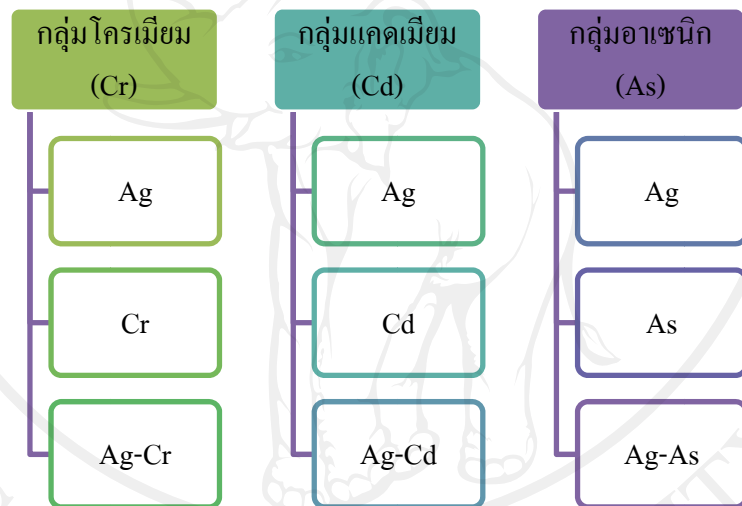
4.1.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ในการทดลองนี้ได้ใช้เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ประกอบไปด้วยยีนจำนวนทั้งสิ้น 8793 ยีน ซึ่งยังคงสภาพการทำงานของเซลล์ปกติและนิยมใช้ในการศึกษาทางด้านพิษวิทยา โดยเซลล์ถูกนำมาจาก Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) ซึ่งถูกนำมาเลี้ยงไว้ในสารละลาย Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (Nissui, Tokyo, Japan) ที่ประกอบไปด้วย 1% Nonessential Amino Acid (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% Fetal Bovine Serum, และ 60 mg/mL Kanamycin ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซ CO₂ 5% เซลล์จะเจริญเติบโตประมาณ 70% จากนั้นจะถูกสัมผัส (Expose) ด้วยสารละลาย ใน 2 รูปแบบ ดังนี้ (1) การสัมผัสด้วยสารละลายเพียงตัวเดียว (Single Exposure) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและนำไปใช้ผสมในลำดับต่อไป (2) การสัมผัสด้วยสารคู่ผสมเพื่อหาสารคู่ผสมที่เกิด synergistic effect หรือ effect อื่น ๆ ที่น่าสนใจ [1]

4.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารกลุ่มผสมด้วยเทคนิค Cytotoxicity Test

การศึกษาพิษวิทยาของสารกลุ่มผสมจำเป็นต้องมีการศึกษาเริ่มต้นจากความเป็นพิษของสารเพียงตัวเดียวก่อนเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในการผสมและเวลาที่เหมาะสมต่อการผสมจากนั้นจึงจะผสมสารกลุ่มผสมและเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษแล้วจึงจะนำผลการทดลองที่ได้ไปเลือกสารกลุ่มผสมที่เหมาะสมที่สุดในการทำเทคนิคไมโครอาร์เรย์ ซึ่งได้ผลเป็นคู่สารผสมที่ระดับความเป็นพิษ High-High ณ เวลาที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง 3 คู่ ดังนี้

- 1) คู่สารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ – โครเมียม (Ag-Cr)
- 2) คู่สารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ – แคดเมียม (Ag-Cd)
- 3) คู่สารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ – อาเซนิก (Ag-As)



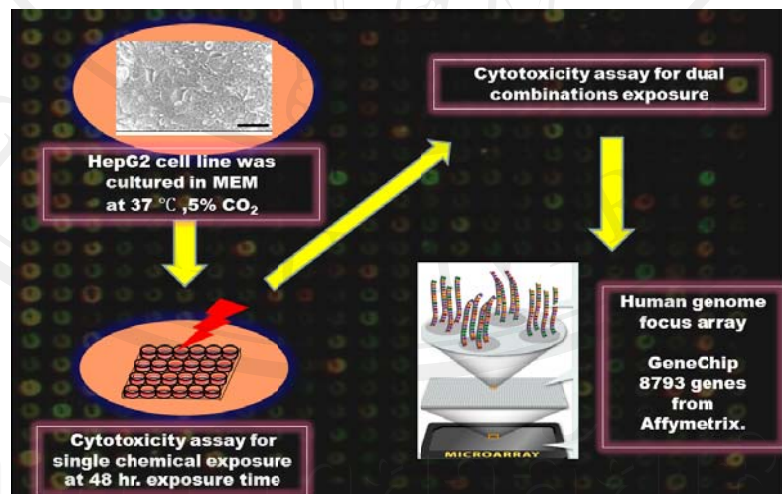
รูปที่ 4.1 แผนภาพแสดงการจัดกลุ่มทดสอบสารผสมแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

โดยมีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารแต่ละชนิด ดังนี้

- 1) อาเซนิก ที่ความเข้มข้น 7 μM
- 2) แคดเมียม ที่ความเข้มข้น 2.6 μM
- 3) โครเมียม ที่ความเข้มข้น 1.1 μM
- 4) อนุภาคนาโนซิลเวอร์ ที่ความเข้มข้น 5 μM

4.1.3 การทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์

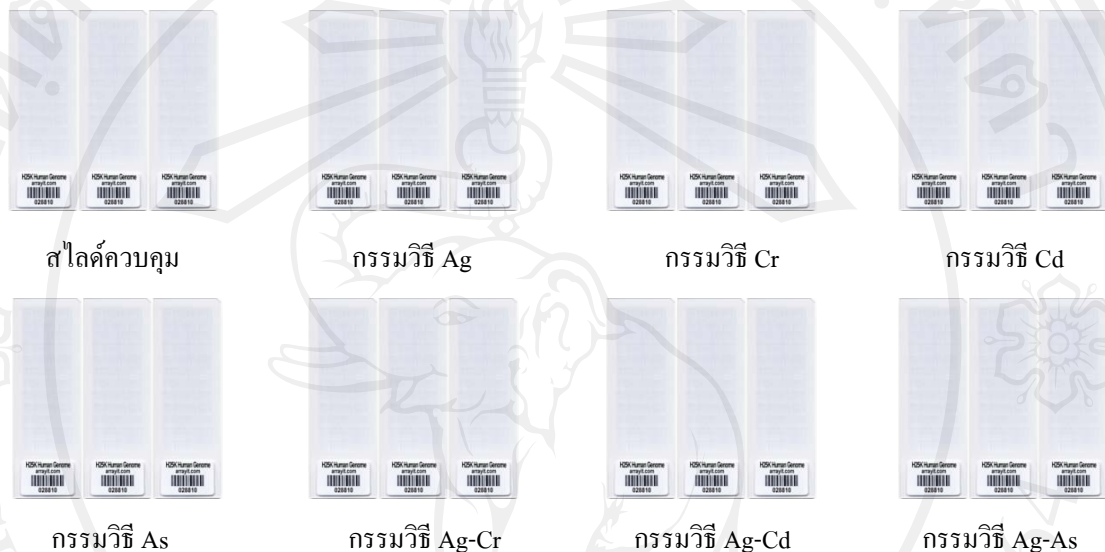
เซลล์ถูกทำให้แตกตัวโดยตรงในงานเพาะเลี้ยงและทำการสกัด RNA ด้วย RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) จากนั้น RNA จะถูกนำไปเตรียมให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบด้วย One-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assay Protocols จากนั้น cDNA จะถูกสร้างขึ้นจาก RNA โดยใช้ One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) โดยการทำงานของ T7-(dT) 24 Primer และ T7 RNA Polymerase Promoter จากนั้นจะสร้าง cRNA จาก cDNA และทำการติดสารไบโอติน (Biotin-Labeled) ซึ่งเป็นการติดสารเรืองแสงด้วย In Vitro Transcription โดยใช้ IVT Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) cRNA ที่มีไบโอตินติดอยู่จะถูกย่อยให้มีเส้นที่สั้นลงโดยใช้เอนไซม์ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีในสารละลายที่มี 40 mM Tris acetate, pH 8.1, 100 mM Potassium Acetate และ 30 mM Magnesium Acetate 10 ไมโครกรัมของ cRNA ที่มีขนาดเล็กลงจะถูกนำไปบ่ม (hybridization) ใน Human Genome Focus Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) ที่มียีนของมนุษย์ 8793 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ณ 45 °C หลังจากการบ่ม (Hybridization) แผ่นของไมโครอาร์เรย์จะถูกล้างด้วย Streptavidin Phycoerythrin โดยใช้เครื่อง Fluidics Station (Affymetrix, Santa Clara, CA). จากนั้นแผ่นสไลด์จะถูกสแกนด้วย Genechip System Confocal Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA) ดังรูปที่ 4.2 เพื่ออ่านค่าการแสดงออกของยีนที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 4.2 ขั้นตอนการทดลองโดยเทคนิคไมโครอาร์เรย์ [1]

4.1.4 แผนการทดลองของข้อมูล

ข้อมูลจากงานวิจัยเรื่อง Analysis of Mixture Toxicity of Dual Combinations for Silver Nanoparticles and Heavy Metals using Toxicogenomics Approach [1] ได้ใช้แผนการทดลองแบบ Reference Design โดยทำการทดสอบแต่ละกรรมวิธีในแต่ละสไลด์การทดลอง และทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี ดังนี้



4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

4.2.1 ข้อมูลดิบที่ได้จากงานวิจัยเรื่อง Analysis of Mixture Toxicity of Dual Combinations for Silver Nanoparticles and Heavy Metals using Toxicogenomics Approach [1] เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนที่ได้รับกรรมวิธีอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (Ag), โครเมียม (Cr), สารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์-โครเมียม (Ag-Cr), แคดเมียม (Cd), สารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์-แคดเมียม (Ag-Cd), อาเซนิก (As) และสารผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์-อาเซนิก (Ag-As) ประกอบไปด้วยยีนจำนวนทั้งสิ้น 8,793 ยีน ทำการจัดกลุ่มเพื่อการวิเคราะห์โดยจะออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มโครเมียม ซึ่งประกอบไปด้วยค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนที่ได้รับกรรมวิธี Ag, Cr และสารผสม Ag-Cr
- 2) กลุ่มแคดเมียม ซึ่งประกอบไปด้วยค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนที่ได้รับกรรมวิธี Ag, Cd และสารผสม Ag-Cd และ
- 3) กลุ่มอาเซนิก ซึ่งประกอบไปด้วยค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนที่ได้รับกรรมวิธี Ag, As และสารผสม Ag-As โดยจะทำการทดสอบเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มดังกล่าว

4.2.2 นำข้อมูลดิบที่ได้มาทำการ Normalized โดยเทคนิค LOWESS [20-23]

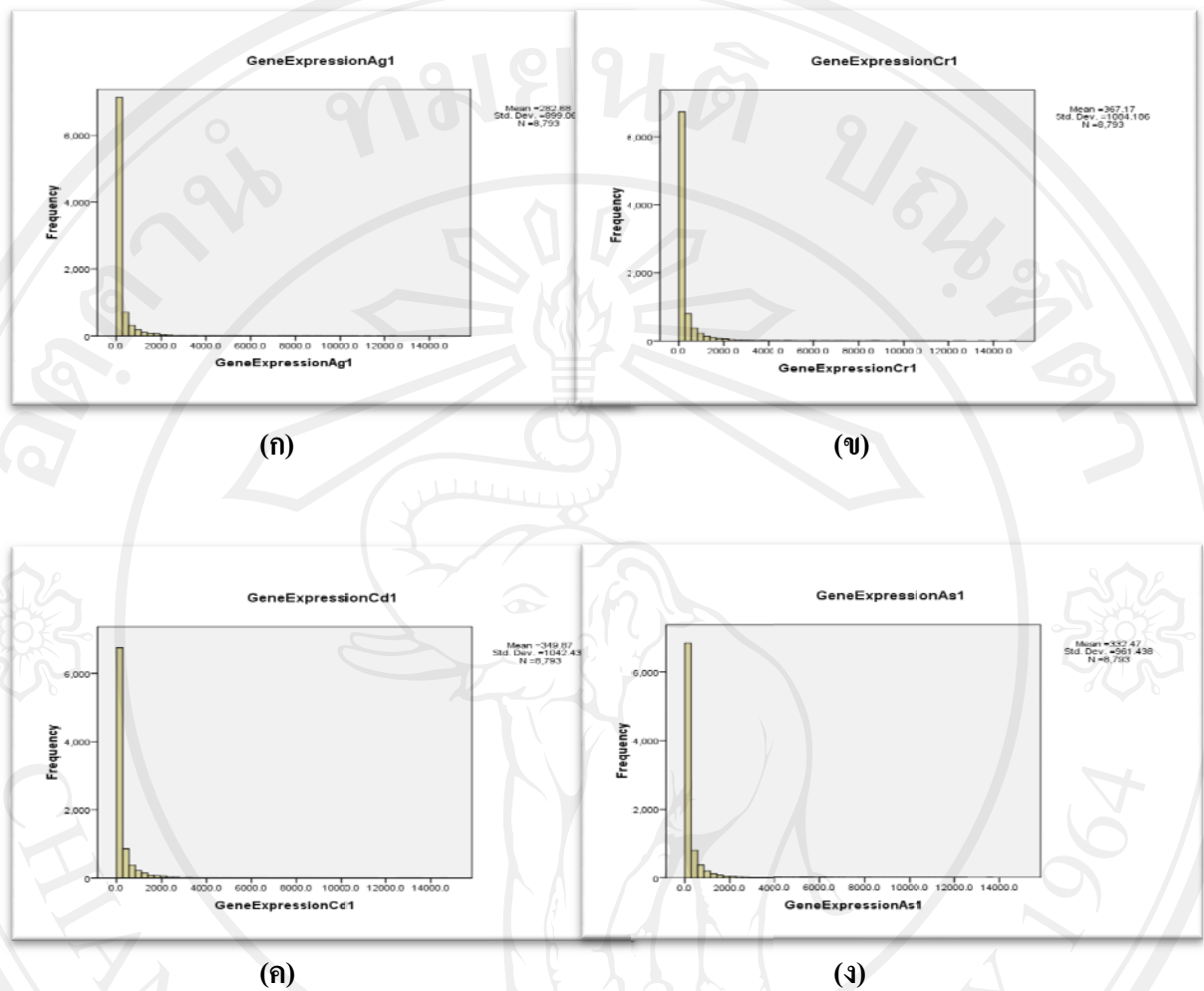
4.2.3 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ด้วยสถิติทดสอบ F_s -test เพื่อระบุยีน ที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้โปรแกรม R/MAANOVA เวอร์ชัน 2.11.0 [12] ช่วยในการคำนวณ กำหนดระดับนัยสำคัญที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้เท่ากับ 0.05

4.2.4 สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล

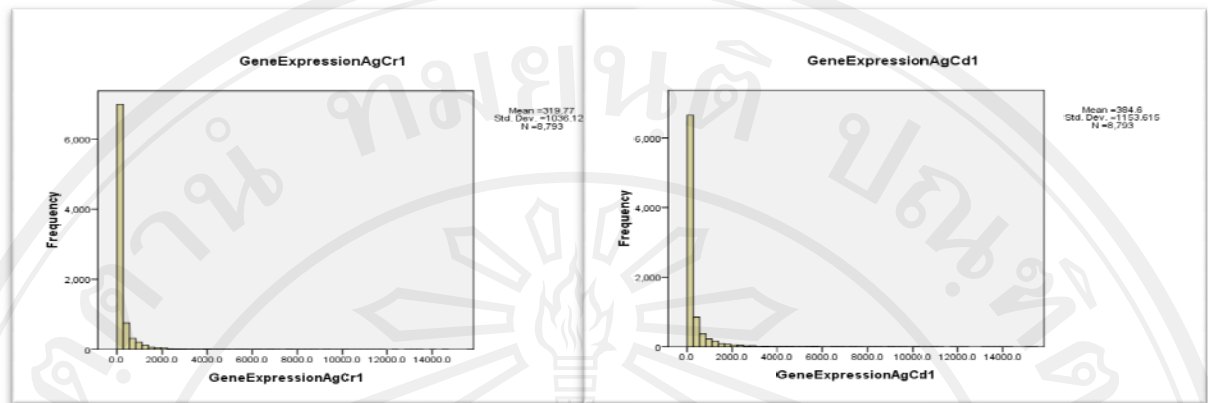
4.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.3.1 ค่าการแสดงออกของยีนภายหลังจากได้รับสารแต่ละกลุ่มกรรมวิธี

ค่าการแสดงออกของยีนถูกวัดจากความเข้มของสารเรืองแสง จากยีนจำนวนทั้งสิ้น 8,793 ยีน โดยแต่ละกรรมวิธีจะมีจำนวน 3 ซ้ำ แต่เนื่องจากในแต่ละกรรมวิธีมีลักษณะการแจกแจงของข้อมูลคล้ายคลึงกันจึงได้นำเสนอเพียง 1 ตัวอย่างจากแต่ละกรรมวิธีในรูปแบบที่ 4.3-4.4

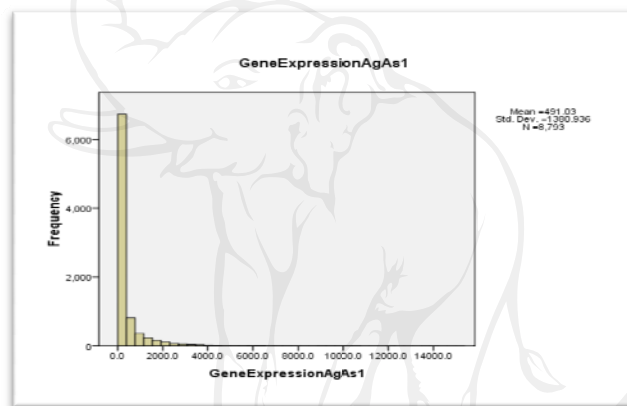


รูปที่ 4.3 ลักษณะการแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงออกของยีน
เมื่อได้รับกรรมวิธี (ก) Ag, (ข) Cr, (ค) Cd และ (ง) As



(ก)

(ข)

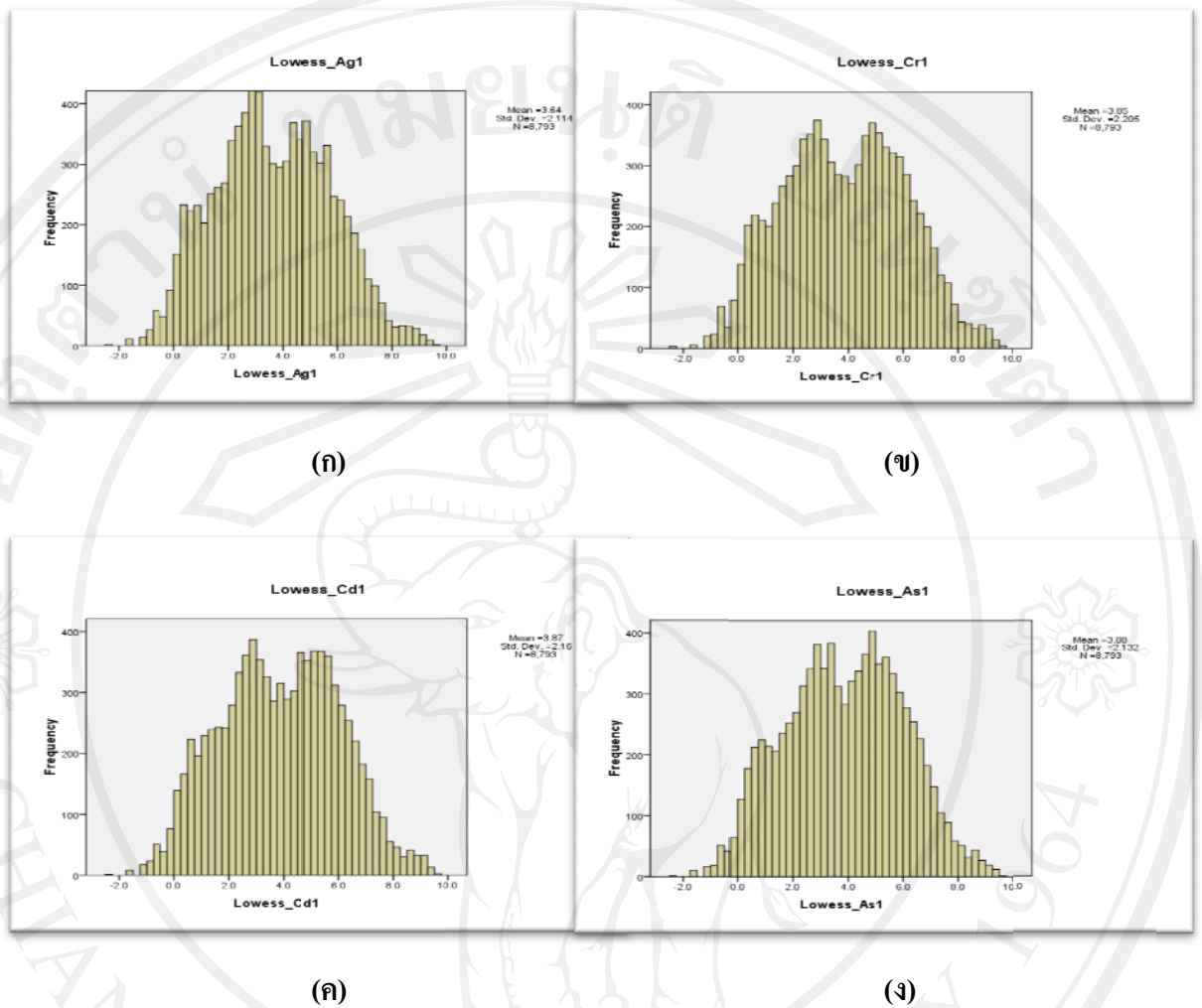


(ค)

รูปที่ 4.4 ลักษณะการแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงออกของยีน
เมื่อได้รับการวิธีสารผสมระหว่าง (ก) Ag-Cr, (ข) Ag-Cd และ (ค) Ag-As

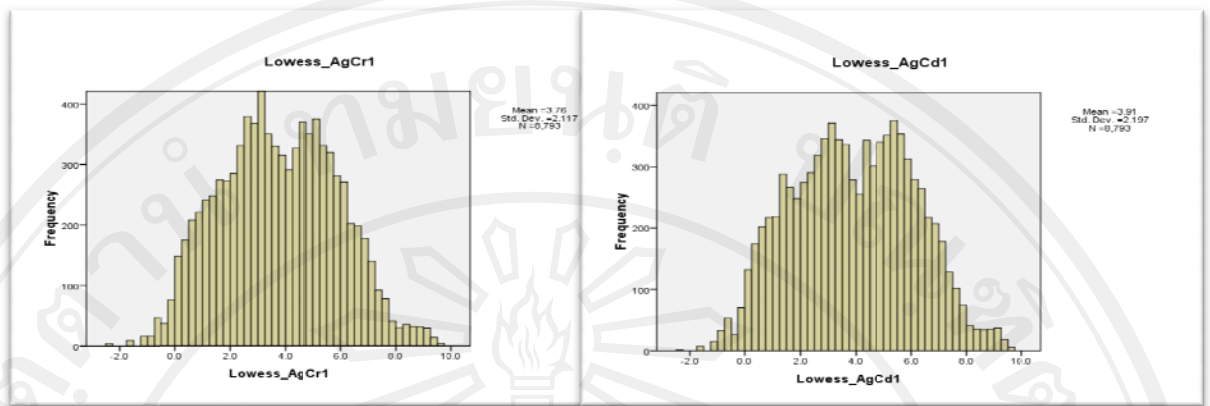
จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 ลักษณะการแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงออกของยีนที่ได้จะมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละกรรมวิธีโดยจะมีลักษณะการแจกแจงแบบเบ้ขวาอย่างชัดเจน

ทำการปรับข้อมูลด้วยการ Normalized โดยวิธี LOWESS ได้ผลดังรูปที่ 4.5-4.6



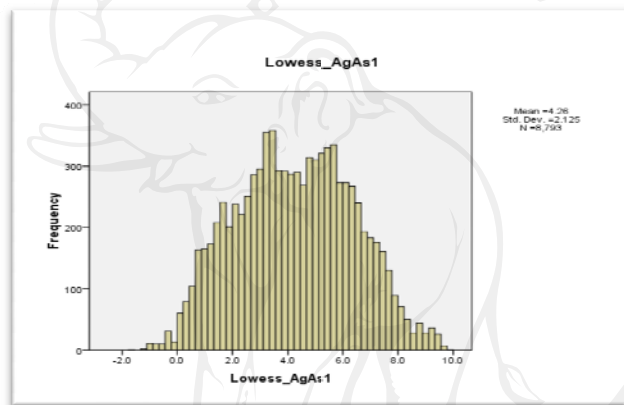
รูปที่ 4.5 การแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงผลออกของอินทรีย์หลัง Normalized โดยวิธี LOWESS
เมื่อได้รับกรรมวิธี (ก) Ag, (ข) Cr, (ค) Cd และ (ง) As

จะเห็นได้ว่า ภายหลังจากการ Normalized โดยวิธี LOWESS แล้ว การแจกแจงความถี่ของ
ค่าการแสดงผลออกของอินทรีย์เมื่อได้รับกรรมวิธีต่าง ๆ จะถูกปรับให้มีการแจกแจงแบบปกติทั้งหมด



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.6 การแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงผลออกของอินทรีย์หลัง Normalized โดยวิธี LOWESS เมื่อได้รับกรรมวิธีสารผสมระหว่าง (ก) Ag-Cr, (ข) Ag-Cd และ (ค) Ag-As

จะเห็นว่า ภายหลังจากการ Normalized โดยวิธี LOWESS แล้ว การแจกแจงความถี่ของค่าการแสดงผลออกของอินทรีย์เมื่อได้รับกรรมวิธีสารผสม จะถูกปรับให้มีการแจกแจงแบบปกติทั้งหมด

4.3.3 ผลการทดสอบค่าการแสดงออกของยีนภายหลังจากได้รับสารแต่ละกลุ่มกรรมวิธี

ในการทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยสถิติทดสอบ F_s จำนวนทั้งสิ้น 8,793 ยีน พบว่าในกลุ่มโครเมียมมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 2,294 ยีน ส่วนในกลุ่มแคดเมียมมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 4,107 ยีน และในกลุ่มอาเซนิกมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 4,130 ยีน

เนื่องจากในจำนวนยีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จัดอยู่ในหลายกลุ่มบทบาทหน้าที่ของยีน [1] ซึ่งในที่นี้จะนำเสนอกลุ่มบทบาทหน้าที่ของยีนที่มีจำนวนยีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด 20 อันดับแรกในแต่ละกลุ่มกรรมวิธี ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 19 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มอาเซนิก เหมือนกันกับเมื่อได้รับสารกลุ่มแคดเมียม แต่มีความแตกต่างในชนิดและจำนวนยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มยีนต่าง ๆ และจะมีความแตกต่างในกลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 19 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มโครเมียม ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 กลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 20 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มโครเมียม
ผลการทดสอบจากกลุ่มโครเมียม (Cr)

จำนวนยีนที่ แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ	ร้อยละ	กลุ่มบทบาทหน้าที่ของยีน (Biological Process) 20 อันดับแรก
345	18.8	1. Regulation of Nucleobase, Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acid Metabolism
318	17.3	2. RNA Biosynthetic Process
296	16.1	3. Protein Modification Process
176	9.6	4. Phosphorylation
171	9.3	5. Cell Death
160	8.7	6. Regulation of Progression Through Cell Cycle
148	8.1	7. Intracellular Transport
138	7.5	8. Cellular Component Assembly
105	5.7	9. Proteolysis
101	5.5	10. RNA Processing
98	5.3	11. Chromosome Organization and Biogenesis (Sensu Eukaryota)
90	4.9	12. Translation
85	4.6	13. Cellular Carbohydrate Metabolic Process
85	4.6	14. mRNA Metabolic Process
85	4.6	15. DNA Packaging
80	4.4	16. Amino Acid Metabolic Process
78	4.3	17. Protein Kinase Cascade
75	4.1	18. DNA Replication
75	4.1	19. Negative Regulation of Cellular Metabolic Process
72	3.9	20. Positive Regulation of Cellular Metabolic Process

ตารางที่ 4.2 กลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 20 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มแคดเมียม
ผลการทดสอบจากกลุ่มแคดเมียม (Cd)

จำนวนยีนที่ แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ	ร้อยละ	กลุ่มบทบาทหน้าที่ของยีน (Biological Process) 20 อันดับแรก
631	18.9	1. Regulation of Nucleobase, Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acid Metabolism
591	17.7	2. RNA Biosynthetic Process
523	15.6	3. Protein Modification Process
295	8.8	4. Cell Death
281	8.4	5. Translation
273	8.2	6. Cellular Component Assembly
271	8.1	7. Intracellular Transport
271	8.1	8. Phosphorylation
243	7.3	9. Regulation of Progression Through Cell Cycle
205	6.1	10. Proteolysis
191	5.7	11. Chromosome Organization and Biogenesis (Sensu Eukaryota)
182	5.4	12. RNA Processing
162	4.8	13. DNA Packaging
149	4.5	14. Cellular Carbohydrate Metabolic Process
147	4.4	15. mRNA Metabolic Process
145	4.3	16. Negative Regulation of Cellular Metabolic Process
124	3.7	17. Amino Acid Metabolic Process
123	3.7	18. DNA Repair
121	3.6	19. Protein Folding
121	3.6	20. Small GTPase Mediated Signal Transduction

ตารางที่ 4.3 กลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 20 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มอาเซนิก
ผลการทดสอบจากกลุ่มอาเซนิก (As)

จำนวนยีนที่ แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ	ร้อยละ	กลุ่มบทบาทหน้าที่ของยีน (Biological Process) 20 อันดับแรก
639	19.0	1. Regulation of Nucleobase, Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acid Metabolism
599	17.8	2. RNA Biosynthetic Process
526	15.6	3. Protein Modification Process
295	8.8	4. Cell Death
281	8.4	5. Translation
274	8.2	6. Cellular Component Assembly
271	8.1	7. Intracellular Transport
271	8.1	8. Phosphorylation
245	7.3	9. Regulation of Progression Through Cell Cycle
208	6.2	10. Proteolysis
191	5.7	11. Chromosome Organization and Biogenesis (Sensu Eukaryota)
182	5.4	12. RNA Processing
162	4.8	13. DNA Packaging
149	4.4	14. Cellular Carbohydrate Metabolic Process
147	4.4	15. mRNA Metabolic Process
147	4.4	16. Negative Regulation of Cellular Metabolic Process
124	3.7	17. Amino Acid Metabolic Process
123	3.7	18. DNA Repair
121	3.6	19. Protein Folding
121	3.6	20. Positive Regulation of Cellular Metabolic Process

4.4 สรุปผลการวิเคราะห์

ในการทดสอบการแสดงออกของยีนด้วย F_s -test จำนวนทั้งสิ้น 8,793 ยีน พบว่าในกลุ่มโครเมียมมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 2,294 ยีน ส่วนในกลุ่มแคดเมียมมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 4,107 ยีน และในกลุ่มอาเซนิกมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 4,130 ยีน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อจัดเรียงลำดับรายชื่อกลุ่มยีนที่มีจำนวนยีนเปลี่ยนแปลงไปจากมากไปหาน้อยพบว่า กลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 19 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มอาเซนิก เหมือนกันกับเมื่อได้รับสารกลุ่มแคดเมียม แต่มีความแตกต่างในชนิดและจำนวนยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มยีนต่าง ๆ และจะมีความแตกต่างในกลุ่มบทบาทของยีนที่มีความถี่สูงสุด 19 อันดับแรกเมื่อได้รับสารกลุ่มโครเมียม ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าผลกระทบของสารอนุภาคซิลเวอร์นาโนและโลหะหนักในกลุ่มอาเซนิก กับกลุ่มแคดเมียมที่มีต่อการแสดงออกของยีนจะเป็นยีนในกลุ่มที่มีบทบาทหน้าที่เหมือนกัน รวมถึงผลของสารกลุ่มโครเมียมด้วย โดยมีค่าสัดส่วนของยีนในแต่ละกลุ่ม ที่มีค่าแตกต่างกัน