

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

โครงการวิจัยนำร่องมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้สูงอายุ: ผลของการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตร่วมกับการให้มะนาวผงกับขมิ้นชัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน ภาวะเหนือพันธุกรรมของจีโนม ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และอัตราการกลับเป็นซ้ำ

(Preliminary study of bladder cancer in the elderly: Effects of lifestyle modification combined with curcumin-lime powder treatment on changes of gene expression, epigenome, biomarkers and recurrence rate)

กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง

ปีงบประมาณ 2553

กลุ่มวิจัยโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ (Emerging Health Risks Cluster)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์

จุลินทร์ ไอภาณุรักษ์

สุพจน์ รัชชานนท์

ชาญชัย บุญหล้า

อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร

สิงหาคม 2554

รายงานความก้าวหน้าผลการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(Faculty of Medicine, Chulalongkorn University)

Project Title: Preliminary study of bladder cancer in the elderly: Effects of lifestyle modification combined with curcumin-lime powder treatment on changes of gene expression, epigenome, biomarkers and recurrence rate

Name of the Investigators: Piyaratana Tosukhowong, Julin Opanuraks ,Supoj Ratchanon , Chanchai Boonla, Apiwat Mutirangura

Year: August 2011

ขอเสนอรายงานผลงานวิจัยตามผลงานที่ได้ ดังนี้

1. ระดับนานาชาติ: Maturada Petsang, Chanchai Boonla, Passakorn

Amnatrakul , Thasinas Dissayabutra, Apiwat Mutirangura, Piyaratana Tosukhowong. Long

interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential (submitted)

2. ระดับชาติ : Maturada Patchsung, Apiwat Mutirangura, Anuthep Burami,

Piyaratana Tosukhowong, Chanchai Boonla. Association of LINE-1 Hypomethylation with

Increased Oxidative Stress in Patients with Bladder Cancer Proceeding of The 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology . 2011; 52-56

3. ระดับนานาชาติ –งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ คาดว่าต้องใช้เวลาต่อ

อีก 6 เดือน

ตอนที่ 1

Abstract : Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential

Maturada Petsang^{1,*}, Chanchai Boonla^{1,*}, Passakorn Amnattrakul², Thasinas

Dissayabutra¹, Apiwat Mutirangura³, Piyaratana Tosukhowong^{1,**}

Departments of Biochemistry¹, Surgery², Anatomy³, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

Purpose: Oxidative stress and genome wide hypomethylation are crucial events in carcinogenesis and may have cause and effect relationship. Here, we evaluated oxidative stress and hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1 or L1) in bladder cancer (BCa) patients and normal individuals.

Patients and Methods: Sixty-one BCa patients and 45 healthy individuals were recruited for the study. To measure methylation level and differentiate LINE-1 loci into 3 classes, hypermethylated, partially methylated and hypomethylated, peripheral blood cells, urinary exfoliated cells and cancerous tissues were evaluated by combined bisulfite restriction analysis PCR. Urinary total antioxidant status (TAS) and plasma protein carbonyl, as oxidative stress markers, were determined by DPPH and DNPH methods, respectively.

Results: LINE-1 methylation levels and patterns in blood and urine cells of BCa patients were different from healthy controls, and the percentage number of hypomethylated loci in urinary exfoliated cells showed the highest degree of differences ($P < 0.001$). Urinary TAS was decreased, while plasma protein carbonyl was increased, in BCa patients compared to the controls. Interestingly, methylation of LINE-1 in blood-derived DNA was positively correlated with urinary TAS in both BCa ($r = 0.618$, $P < 0.001$) and control ($r = 0.469$, $P = 0.001$) groups. Based on ROC analysis, urinary hypomethylated LINE-1 loci and plasma protein carbonyl provided the best diagnostic potential with an area under curve of 0.848 and 0.819, respectively. Combination test improved the diagnostic power to sensitivity 96% and specificity 96%.

Conclusion: LINE-1 methylation is inversely associated with enhanced oxidative stress both in normal and cancer subjects, implying the cause and effect

relationship. The patients had higher LINE-1 hypomethylation levels and number of hypomethylated loci in both blood- and urine-derived cells, and oxidative stress than normal. LINE-1 methylation pattern in urinary exfoliated cells and systemic oxidative stress marker are promising biomarkers for future BCa screening and treatment monitoring.

Keywords: Bladder cancer, epigenetics, LINE-1, methylation, urinary exfoliated cells, oxidative stress, global hypomethylation

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

วัตถุประสงค์ : ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะสัมพันธ์กับการลดลงของระดับเมทิลเลชัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของเซลล์ในปัสสาวะ และศึกษาคุณค่าทางคลินิกในการวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วิธีการศึกษา: ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 61 ราย และคนปกติจำนวน 45 ราย แล้ววัดระดับการเกิด methylation ทั้งหมด รวมทั้ง $^mC^uC$ (partially methylated loci) และ $^uC^uC$ (hypomethylated) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็ง ด้วยวิธี combined bisulfate restriction analysis of LINE1 (COBRA LINE1) วัดระดับ TAS ในปัสสาวะ และระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ด้วยวิธี DPPH และ DNPH assay ตามลำดับ

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาระดับตัวบ่งชี้รูปแบบของการเกิด LINE1 methylation คือ $^uC^uC$ พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ $^uC^uC$ ของเซลล์ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ TAS ต่ำแต่มีระดับ protein carbonyl สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติและ ผลการวิเคราะห์ ROC analysis พบค่า $^uC^uC$ ของเซลล์ในปัสสาวะให้ค่า AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.848 (sensitivity = 80% และ specificity = 85%) นอกจากนี้เมื่อใช้การตรวจ $^uC^uC$ ของเซลล์ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมาพร้อมกันทำให้เพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจขึ้นเพิ่มขึ้น (sensitivity = 96% and specificity = 96%)

สรุป: ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะและมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ และยังพบว่าระดับ LINE1 methylation ที่ต่ำลงสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้นและการตรวจวัด ^{13}C ของเซลล์ในปัสสาวะ อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) เป็นโรกระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้ทั่วโลก โดยพบบ่อยเป็นอันดับสองในกลุ่มมะเร็งทางเดินปัสสาวะ และเป็นลำดับที่หกจากมะเร็งทุกชนิดอุบัติการณ์โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆทั่วโลก (1) ร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นชนิด urothelial carcinoma (UC) ซึ่งมีอัตราการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) สูงถึงร้อยละ 80 ภายในเวลา 5 ปี (2) เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะไม่มีอาการผิดปกติอย่างอื่น ยกเว้นการพบปัสสาวะเป็นเลือดโดยไม่มีอาการเจ็บปวด ทำให้การวินิจฉัยพบมะเร็งชนิดนี้ล่าช้า และผู้ป่วยร้อยละ 20-30 (3) พบว่ามีการลุกลามเข้าสู่ชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะแล้วเมื่อแรกวินิจฉัย ดังนั้นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจึงจัดเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุในประเทศไทย

กระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อาศัยปัจจัยร่วมหลากหลาย (complex and multifactorial process) ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การสูบบุหรี่ (4) และความเสี่ยงจะสูงขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น (5) ในควันบุหรี่มีสารอะโรมาติกเอมีน (aromatic amines) และสารก่อมะเร็ง (carcinogens) อื่นๆ หลายชนิด ที่จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ผลการศึกษาที่ผ่านมายืนยันว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (3) ภาวะเครียดจากออกซิเดชันไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic mutation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA) เท่านั้นแต่ยังมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic change) อีกด้วย

การควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับการถอดรหัส (transcriptional control) เช่น กระบวนการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ (DNA methylation) กระบวนการเติมหมู่อะซิetylของโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) และ กระบวนการตัดหมู่อะซิetyl (histone deacetylation) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงของภาวะเหนือพันธุกรรม หลายแบบ แต่ที่พบบ่อยและมีรายงานมากที่สุดคือ global hypomethylation (6-8)

กลไกการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ อาศัย เอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) และใช้ s-adenosylmethionine (SAM) เป็น methyl donor หมู่เมทิลจะถูกเติมให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่บริเวณ CpG dinucleotides หรือ CpG Islands หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน แต่ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด เมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือมีปริมาณสารอนุมูลอิสระสูง เซลล์จะสร้างกลูตาไทโอน (glutathione, GSH) เพิ่มมากขึ้น จากกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่สลายจากกรดอะมิโนโฮโมซิสเทอีน (homocysteine) ทำให้ปริมาณโฮโมซิสเทอีนลดลง จึงเพิ่มการสร้างโฮโมซิสเทอีนจากกรดอะมิโนเมไทโอนีน (methionine) ซึ่งต้องใช้ SAM ร่วมด้วย ทำให้ปริมาณ SAM ในเซลล์ลดลง และส่งผลต่อกระบวนการ DNA methylation (9) นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระยังเป็นต้นเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย โดยการไปออกซิไดซ์เบสกวานีน (guanine) เกิดเป็น 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) แม้จะเกิดอย่างไม่จำเพาะแต่ก็อาจเกิดขึ้นได้ในบริเวณ CpG dinucleotides ซึ่งมีผลขัดขวางการจับของเอนไซม์ DNMT ในการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกับเบสกวานีนตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น (10, 11) ดังนั้นจากกลไกที่กล่าวนี้ เมื่อมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงน่าจะส่งผลให้เกิดการลดลงของ DNA methylation ของทั้งจีโนมหรือ global DNA hypomethylation ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

Long Interspersed Nuclear Element 1 (LINE1) ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนมหรือ global methylation เนื่องจาก LINE1 เป็น retrotransposon ที่มีมากมายกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของมนุษย์ (12) คิดเป็นประมาณ 17% ของดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม (13) สำหรับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายการศึกษาที่พบ hypomethylation ของ LINE1 (6, 8, 14)

เนื่องจากเมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานที่ LINE1 hypomethylation สัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (14) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (3, 15) แต่ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับการเกิด LINE1 methylation มาก่อน ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ LINE1 methylation ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเทียบกับคนปกติสุขภาพดี และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งถือเป็นการศึกษาแรกในประเทศไทย และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกทาง epigenetics ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากขึ้นและเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ
2. เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
3. เพื่อศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer, BCA)

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลก และอุบัติการณ์มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบมากเป็นอันดับที่ 6 ของมะเร็งที่พบทั่วโลก (1) และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 4 ในเพศชาย และลำดับที่ 8 ในเพศหญิง (16) อุตบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงประมาณ 3-4 เท่า (17) โดยมีความเสี่ยงสูงขึ้นตามอายุที่มากขึ้น ส่วนใหญ่พบในกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป (5) ในประเทศไทยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบได้ประมาณ 4.2 รายในเพศชายและ 1.3 รายในเพศหญิง ต่อประชากร 100,000 ราย (18) ประมาณร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่พบเป็นชนิด urothelial carcinoma (UC) ซึ่งมีอัตราการกลับเป็นมะเร็งซ้ำภายหลังการผ่าตัด สูงถึงร้อยละ 80 ภายในระยะเวลา 5 ปี (2)

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือการสูบบุหรี่ ส่วนปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น การได้รับสารหนู (arsenic) ในน้ำดื่มและอาหารทะเลบางชนิด (19) การทำงานในโรงงานผลิตสีและยาง (20) การได้รับสารก่อมะเร็งและสารพิษเหล่านี้จะทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เกิดสารอนุมูลอิสระ (reactive species) และการทำลายดีเอ็นเอ อันเป็นสาเหตุของการสะสมการกลายพันธุ์ของยีนจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และการก่อมะเร็ง

ในสภาวะปกติ กระบวนการสร้างพลังงานจากสารอาหารที่บริโภคจำเป็นต้องใช้ออกซิเจน ทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (oxidants) ที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical (OH^\cdot) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและเซลล์ได้ ทำให้โมเลกุลไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง

เป็นลูกใช้กับโมเลกุลอื่นหรือเซลล์ข้างเคียงได้ ในสภาวะปกติร่างกายมีกระบวนการที่จะทำลายหรือยับยั้งความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมได้ โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) หรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavengers) หลายชนิดทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) และได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี เป็นต้น แต่ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากเกินไปกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะต้านหรือป้องกันได้ ภาวะนี้เรียกว่า ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลของเซลล์จนเกิดพยาธิสภาพของเซลล์หรือเกิดโรคขึ้น สารชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมายคือ ไขมัน โปรตีน และสารพันธุกรรม จะถูกออกซิไดส์กลายเป็นผลิตภัณฑ์ออกซิเดชัน (oxidative damage products) เช่น malondialdehyde (MDA) จากไขมัน protein carbonyl จากโปรตีน และ 8-hydroxydeoxy guanine (8-OHdG) จากดีเอ็นเอ เป็นต้น หลายการวิจัยแสดงให้เห็นว่า oxidative stress มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด อาทิเช่น โรคหัวใจ (21) โรคเบาหวาน (22) โรคไตและโรคหลอดเลือด (23) เป็นต้น และมีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ (3, 15) และเป็นที่ยอมรับกันว่า oxidative stress เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (15, 24)

กระบวนการก่อมะเร็งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อนมาก ดีเอ็นเอที่เสียหายจากภาวะ oxidative stress สามารถชักนำให้เกิดระยะเริ่มก่อตัวของมะเร็งได้ ยกตัวอย่างเช่น 8-OHdG เป็น oxidative DNA damage product เกิดจากสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเบสกวีนีน (guanine) บนสายดีเอ็นเอซึ่งเป็น oxidative DNA damage product ที่พบได้บ่อยที่สุด (25, 26) สามารถทำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) ขึ้นได้ คือการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น T (G-T transversions) (27) ดังนั้นถ้าเกิดภาวะ oxidative stress สูงก็จะทำให้เกิดการสะสมของการกลายพันธุ์ในเซลล์ปริมาณมาก โดยเฉพาะในยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) และยีนมะเร็ง (oncogenes) จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง

2. ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) และการก่อมะเร็ง

การควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับการถอดรหัส (transcriptional control) เช่น กระบวนการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ (DNA methylation) กระบวนการเติมหมู่อะซิetylของโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) และ กระบวนการตัดหมู่อะซิetyl (histone deacetylation) กระบวนการ DNA methylation มีความสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็ง เนื่องจาก DNA methylation มีผลโดยตรงต่อการเกิด transcription ของยีน กระบวนการ DNA methylation เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอที่ไม่ทำให้ลำดับเบสมีการเปลี่ยนแปลง สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยการเติมหมู่เมทิล (methyl, CH₃) ไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในเบสไซโตซีน (cytosine, C) ที่อยู่ติดกับกวีนีน (guanine, G) หรือ CpG (CpG dinucleotide) กลไกการเติมหมู่เมทิล อาศัย เอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) โดยเอนไซม์ DNMT จะเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เมทิลจาก s-

adenosylmethionine (SAM) ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ให้หมู่เมทิล (methyl donor) ไปที่ตำแหน่งที่ 5 ของ วงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5-MeC) และ SAM เปลี่ยนเป็น s-adenosylhomocysteine (SAH) (9)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีนหลายยีนในเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงแบบแผนของ DNA methylation (DNA methylation pattern) แต่การเปลี่ยนแปลงแบบที่พบได้ทั่วไปในโรคมะเร็งในคนนั้นมี 2 แบบได้แก่ 1. global hypomethylation ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนมะเร็ง (oncogene) และ 2. regional hypermethylation ของ CpG island ที่ทำให้ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ไม่สามารถแสดงออกได้(28) นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิด global hypomethylation ทำให้อัตราการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นนำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม (genome instability) ในที่สุด (29) ซึ่งแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงแบบแผนของ DNA methylation ที่ทำให้การแสดงออกของยีนผิดปกติไปนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

ปัจจุบันใช้ระดับ methylation ใน Long Interspersed Nuclear Element (LINE1) เป็นตัวแทนของระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนม (global hypomethylation) (7, 8) เนื่องจาก LINE1 พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม LINE1 มีคุณสมบัติเป็น retrotransposon คือสามารถจำลองตัวเองขึ้นมาแล้วไปแทรกแบบสุ่มในบริเวณอื่นของจีโนมได้ ซึ่งในจีโนมของมนุษย์มี LINE1 ที่สามารถเกิดการลอกรหัสได้หรือ active LINE1 สามารถจำลองตัวเองแล้วเคลื่อนที่ไปแทรกตำแหน่งอื่นๆในจีโนม (retrotransposition) มีประมาณ 3000-4000 copy (30)

สำหรับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะการเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetic ที่พบมากคือ global hypomethylation โดยมีหลายการศึกษาที่พบ LINE1 hypomethylation เช่น การศึกษาของ Choi และคณะ(6) โดยศึกษาระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder tumor tissue) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติที่อยู่ติดกัน (adjacent normal bladder urothelium) ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 34 ราย พบว่าระดับ LINE1 methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่าเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติ normal tissue อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การศึกษาของ Wilhelm และคณะ(14) ที่ศึกษาระดับ LINE1 methylation ใน เซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood cells) ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับควบคุมคนปกติ พบว่า ระดับ LINE1 methylation ที่ต่ำที่สุดสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะขึ้น 1.8 เท่า สำหรับประเทศไทยการศึกษาของ Mutirangura และคณะ (8) พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มีระดับ LINE1 hypomethylation อยู่ระหว่าง 65.37–70.98% ซึ่งสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ (64.36-65.90%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลของ oxidative stress ต่อ DNA methylation

ภาวะ oxidative stress ไม่เพียงสามารถส่งเสริมการเกิดมะเร็งผ่านทาง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic alteration) ที่เกี่ยวข้องกับลำดับเบสของดีเอ็นเอ แต่ยังมีผลต่อกลไกการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetics) อีกด้วย

ภาวะ oxidative stress ส่งผลต่อ epigenetic change อย่างไรก็ดีไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่เสนอกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับผลของสารอนุมูลอิสระต่อ DNA methylation ปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย ซึ่งความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA lesions) โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง CpG dinucleotide จะรบกวนการทำหน้าที่เป็นสับสเตรต (substrate) ของดีเอ็นเอสำหรับเอนไซม์ DNMT มีผลให้เกิด DNA methylation น้อยลง หรือเกิด global hypomethylation (31) ยกตัวอย่างเช่น 8-OHdG ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดซ์เบสกวัวนีน โดย ROS ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด แม้จะเกิดอย่างไม่จำเพาะเจาะจง แต่ก็อาจเกิดขึ้นได้ในบริเวณลำดับเบสที่เป็น CpG dinucleotide ทำให้ไปยับยั้ง methylation ของเบส cytosine ที่อยู่ติดกับเบส guanine ตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น โดยจะไปขัดขวางการเข้าจับของ DNMT (10, 11) นอกจากนี้ 8-OHdG แล้ว O^6 -methylguanine ก็เป็น DNA damage product อีกชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากผลของการออกซิไดซ์ของ ROS ซึ่งสามารถขัดขวางการเข้าจับของ DNMT ได้เช่นกัน (32, 33) หาก 8-OHdG ไม่ได้รับการซ่อมแซมที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ G-T transversion ได้ ซึ่งหากเกิดที่บริเวณ CpG dinucleotide จะทำให้มีปริมาณ CpG dinucleotide ลดลง ส่งผลให้เกิดการลดลงของ DNA methylation ได้ (34) นอกจากนี้ oxidative stress ยังอาจทำให้น้ำตาลดีออกซีไรโบสที่เป็นแกนกลางของสายดีเอ็นเอถูกทำลายจนขาดออกจากกันได้ (double strand break) โดยพบว่า การขาดออกจากกันของสายดีเอ็นเออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ DNA methylation ได้ (35) การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าความเสียหายของดีเอ็นเอจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน มีผลต่อแบบรูปแบบ DNA methylation ซึ่งนำมาสู่การแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ และอาจส่งเสริมการเกิดมะเร็งได้ในที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บสารตัวอย่าง (Specimen collection)

1.1. การเก็บปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า (first morning urine)

วิธีการเก็บ คือ เก็บปัสสาวะในตอนเช้า โดยให้ปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อนแล้วเก็บปัสสาวะช่วงกลางใส่ภาชนะปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้นำมาปั่น 4000 rpm

นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนใส (supernate) และส่วนที่เป็นตะกอน (cell pellet) เก็บทั้งสองส่วนที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์

1.2. การเก็บเลือด (Heparinized blood)

เจาะเลือด จากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ plasma เก็บที่ -20°C ก่อนการวิเคราะห์ ส่วน buffy coat เก็บที่ 4°C รอการสกัดดีเอ็นเอ

1.3. การเก็บเนื้อเยื่อ (Biopsy)

ศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นผู้ทำการส่องกล้อง และตัดเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ขนาดประมาณ $1 \times 1 \times 1$ cm. แล้วใส่ลงในหลอดที่มี RNA stabilizer 1 ml แล้วเก็บที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์

2. วิธีวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

2.1. การตรวจระดับ protein carbonyl ในพลาสมา โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay (36)

วิธีทำคือ เจือจางพลาสมาด้วย phosphate buffer saline (PBS) 20 เท่า โดยดูดพลาสมา 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PBS อยู่ 570 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบน 250 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม DNPH ลงไป 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอด blank ของแต่ละตัวอย่างพลาสมา เติม 2N HCl ลงไปแทน แล้วนำทุกหลอดไป incubated ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 45 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ เติม 20% TCA ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอด วางหลอดไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol : ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม guanidine hydrochloride (GdmCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายไม่หมด ให้นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ GdmCl ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (OD_{375}) โดยใช้ blank ของแต่ละตัวอย่างปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ ปริมาณ protein carbonyl ในพลาสมาจะรายงานในหน่วยนาโนโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (nmol/mg protein)

การคำนวณหาปริมาณ protein carbonyl

$$\text{Protein carbonyl (nmol/ml)} = \text{OD}_{375} \times 45.45$$

Protein carbonyl (nmol/mg) = protein carbonyl (nmol/ml)/protein (mg/ml)

2.2. การตรวจระดับ TAS ในปัสสาวะ โดยวิธี spectrophotometric DPPH assay (37)

วิธีทำคือ นำปัสสาวะ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ ของ sodium phosphate buffer 400 ไมโครลิตร และ DPPH solution 400 ไมโครลิตร แล้ว incubate ไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การคำนวณหาปริมาณปริมาณ TAS

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = ((\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{test}}) / \text{OD}_{\text{blank}}) \times 100$$

2.3. การวิเคราะห์โปรตีนในพลาสมา โดยวิธี dye binding method (38)

วิธีทำคือ นำ พลาสมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับ CBB reagent 2.5 มิลลิลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

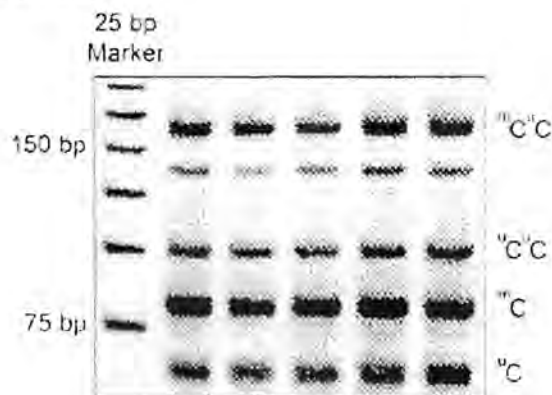
การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{Protein (mg/ml)} = (\text{ความเข้มข้นของ standard} \times \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{standard}}$$

2.4. การตรวจระดับการเกิด methylation ของ LINE1 โดยวิธี combined bisulfite restriction analysis of LINE1 (COBRA-LINE1) (8)

วิธีทำคือ สกัดแยก DNA โดยใช้ชุดสกัด high pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) ตรวจสอบปริมาณ DNA ที่สกัดแยกได้โดยนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาหาอัตราส่วนของทั้งสองค่าเปรียบเทียบปริมาณค่าอัตราส่วนที่ได้ แล้วแบ่ง DNA 250 นาโนกรัม ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรจากนั้นนำ DNA มาทำ bisulfite treatment เริ่มต้นโดยเติม 2M NaOH 5.5 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้ DNA คลายเกลียวเป็นสายเดี่ยว แล้วเติม hydroquinone 30 ไมโครลิตร เขย่าทันทีที่จะเกิดสีเหลือง จากนั้นเติม sodium bisulfate 520 ไมโครลิตร incubate ที่ 50 °C ประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วจึง purified โดยใช้ Wizard DNA Clean-up System และละลาย DNA ด้วยน้ำอุ่น แล้ว desulfonated ด้วย 3M NaOH 5.5 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอน DNA ด้วยการเติม glycogen 1 ไมโครลิตร ตามด้วย ammonium acetate 17 ไมโครลิตร และ absolute

isopropanol 220 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ด้วยมือ ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C เมื่อครบประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอน DNA นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที สุดท้ายละลายกลับด้วยน้ำ 20 ไมโครลิตร โดย bisulfite-treated DNA ที่ได้จะถูกเก็บที่ -20°C จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE1 ด้วยเทคนิค COBRA LINE1 ขั้นตอน PCR จะใช้ forward primer คือ 5'-CGTAAGGGGTTAGGGAG TTTT-3' และ reverse primer คือ 5'-RTAAAACCTCCRAACCAAATATAAA-3' ซึ่งส่วนประกอบของสารเคมีในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 2 ภายใต้อุณหภูมิ denature ที่อุณหภูมิ 95°C , 15 นาที ตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95°C , 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50°C , 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C , 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C , 7 นาที แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ TaqI และ TaqI ชนิดละ 2 U ใน 1xNEB3 buffer บ่มที่ 50°C ซ้ำมคืน หรือประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโดย 8% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อม SYBR Green และตรวจวัดระดับความเข้ม (intensity) ของ band ที่ตำแหน่ง 160 bp ($^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) 98 bp ($^{13}\text{C}^{12}\text{C}$) 80 bp ($^{12}\text{C}^{13}\text{C}$) และ 62 bp ($^{12}\text{C}^{12}\text{C}$) (ภาพที่ 1) ด้วยเครื่อง PhosphorImager โดยใช้ Image Quant software



ภาพที่ 1 ตัวอย่างเจลแสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ LINE1 methylation โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมแถบดีเอ็นเอ และวัดระดับความเข้ม ของ band ที่ตำแหน่ง 160 bp ($^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) 98 bp ($^{13}\text{C}^{12}\text{C}$) 80 bp ($^{12}\text{C}^{13}\text{C}$) และ 62 bp ($^{12}\text{C}^{12}\text{C}$)

การคำนวณหาระดับการเกิด methylation (39)

1. นำความเข้มของ band (%band) มาหารด้วยจำนวนเบส ดังต่อไปนี้
 - 1.1. % band ที่ 160 หารด้วย 160 = A
 - 1.2. % band ที่ 98 หารด้วย 94 = B

$$\begin{aligned}
 1.3. \% \text{ band ที่ } 80 \text{ หารด้วย } 77 &= C \\
 1.4. \% \text{ band ที่ } 62 \text{ หารด้วย } 60 &= D \\
 2. \text{ กำหนดให้ band ที่ } 18 \text{ bp} &= E = D - B \\
 3. \% \text{ methylation} &= {}^mC / ({}^uC + {}^mC) \\
 &= 100X(C+A) / (C+A+A+B+D) \\
 4. \% \text{ partial methylated loci } ({}^mC{}^uC) &= {}^mC{}^uC / ({}^mC{}^uC + {}^uC{}^uC + {}^mC + {}^uC) \\
 &= 100X(A) / (((C-D+B)/2) + A + D) \\
 5. \% \text{ hypomethylated loci } ({}^uC{}^uC) &= {}^uC{}^uC / ({}^mC{}^uC + {}^uC{}^uC + {}^mC + {}^uC) \\
 &= 100XB / (((C-E)/2) + A + E + B)
 \end{aligned}$$

ผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีประชากรเข้าร่วมโครงการทั้งหมด 106 ราย แบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 61 รายและกลุ่มคนปกติซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 45 ราย ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติโดยมีเพศ อายุและดัชนีมวลกาย

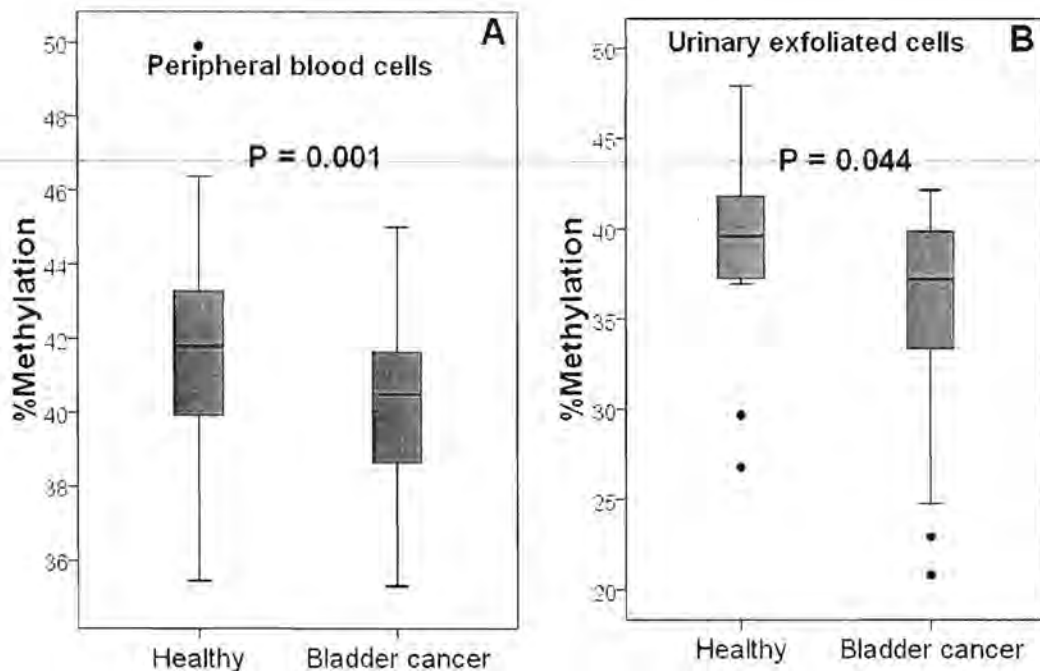
	กลุ่มตัวอย่าง		P value
	ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	คนปกติ	
จำนวน (ราย)	61	45	
เพศ			0.678 ^a
- ชาย	52 (85.25%)	37 (82.22%)	
- หญิง	9 (14.75%)	8 (17.77%)	
อายุ (ปี) (mean±SD)	65.11 ± 12.16	61.00 ± 13.25	0.100 ^b
BMI (kg/m ²) (mean±SD)	22.24 ± 3.71	23.15 ± 2.45	0.188 ^b

^a ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Chi-square test

^b ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Independent samples t-test

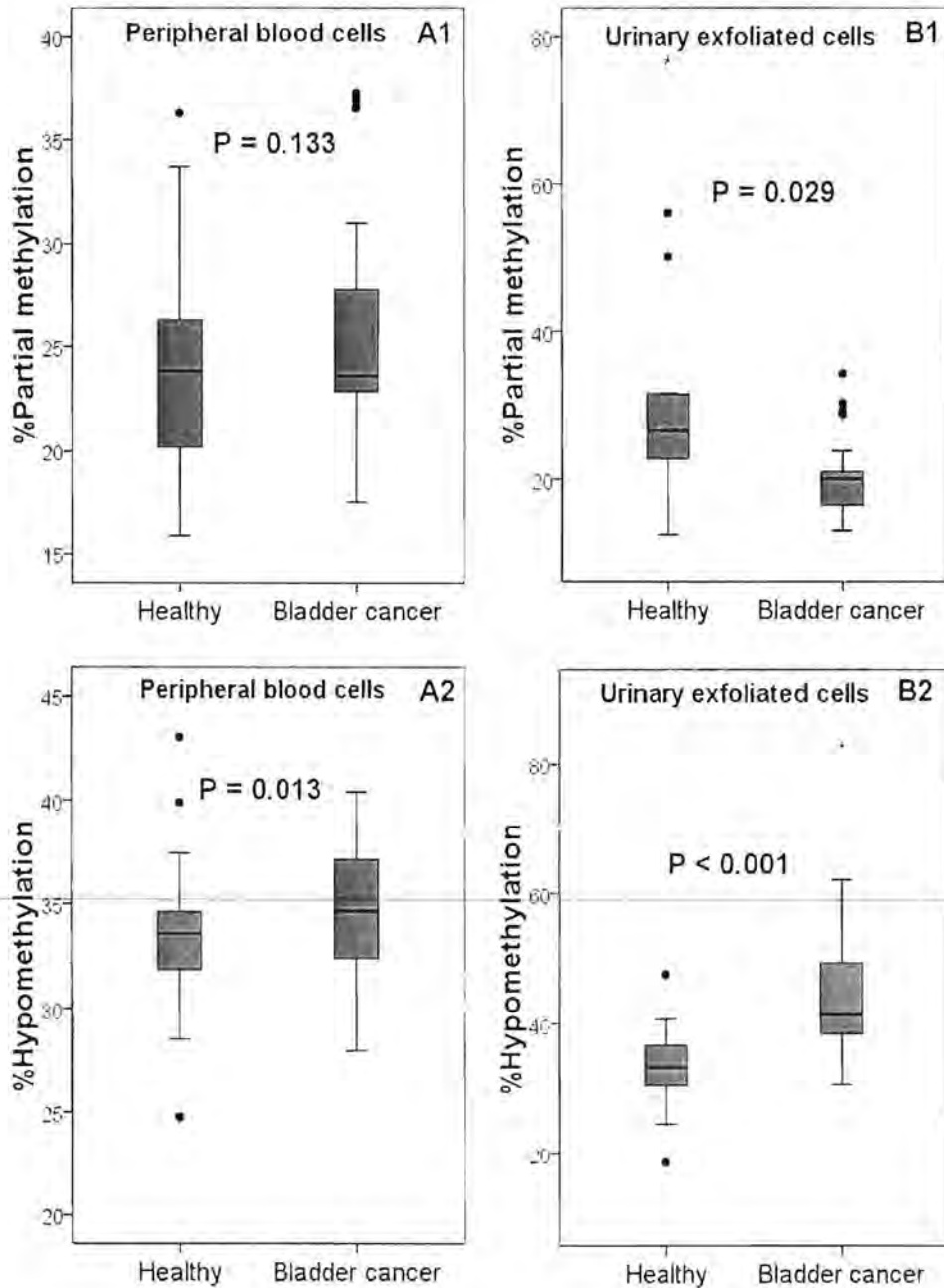
ผลการศึกษาระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ

ศึกษาระดับ LINE1 methylation ซึ่งจะบ่งบอกระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนม โดยการศึกษาในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการวิเคราะห์พบว่า ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ($n = 60$) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ ($n = 45$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median(IQR): 40.49 (3.09) vs. 41.79 (3.55)) ($P = 0.001$) (ภาพที่ 2A) และจากการศึกษาในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์ในปัสสาวะผลการวิเคราะห์พบว่า ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ($n=30$) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ ($n=14$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (median(IQR): 37.21 (7.33) vs. 39.61 (4.92)) ($P = 0.044$) (ภาพที่ 2B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับการเกิด LINE1 methylation ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 2 Box-Whisker plot แสดงระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: ระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ B: แสดงระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

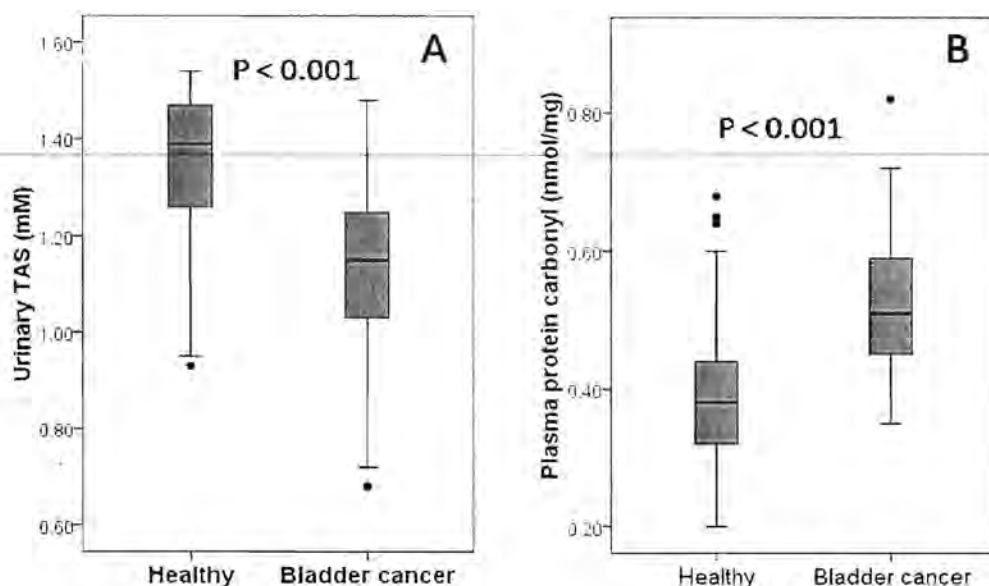
นอกจากระดับ methylation โดยรวมแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอีก 2 แบบคือ partial methylated form (partially methylation, ${}^mC^uC$) และ hypomethylated form (hypomethylation, ${}^uC^uC$) ในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการวิเคราะห์พบว่า ร้อยละการเกิด hypomethylation ของผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สถิติ (median(IQR): 34.66 (4.98) vs. 33.59 (2.88)) ($P = 0.013$) แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ partial methylation สำหรับการศึกษานี้ในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์ในปัสสาวะ พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีร้อยละการเกิด partial methylation ต่ำกว่า (median(IQR): 19.99 (5.10) vs. 22.64 (14.55)) ($P = 0.029$) แต่มีร้อยละการเกิด hypomethylation สูงกว่า (median(IQR): 41.42 (11.02) vs. 33.28 (6.85)) ($P < 0.001$) กลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3) ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับของ hypomethylation สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ (ภาพที่ 3 A2 และ B2) แต่พบระดับ partial methylation ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะเซลล์ในปัสสาวะเท่านั้น (ภาพที่ 15 B1) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 15 A1)



ภาพที่ 3 Box-Whisker plot แสดงระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: แสดงระดับ partial methylation และ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ร้อยละการเกิด hypomethylation ของผู้ป่วย (n= 60) สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (n=45) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ partial methylation B: แสดงระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์ในปัสสาวะ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (n=30) มีร้อยละการเกิด partial methylation ต่ำกว่าแต่มีร้อยละการเกิด hypomethylation สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (n=14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

ศึกษาภาวะ oxidative stress จากระดับ total antioxidant status ในปัสสาวะซึ่งบอกระดับของสารต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาที่เป็นตัวบ่งชี้ระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับ TAS ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเท่ากับ 1.12 ± 0.20 mM ascorbate equivalence และกลุ่มคนปกติเท่ากับ 1.33 ± 0.16 mM ascorbate equivalence ซึ่งระดับ TAS ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (ภาพที่ 4A) และจากการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมีค่าเท่ากับ 0.52 ± 0.11 nmol/mg และกลุ่มคนปกติเท่ากับ 0.39 ± 0.11 nmol/mg ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (ภาพที่ 4B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่มีระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าภาวะปกติ



ภาพที่ 4 Box-Whisker plot แสดงระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: แสดงระดับ TAS ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ B: แสดงระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

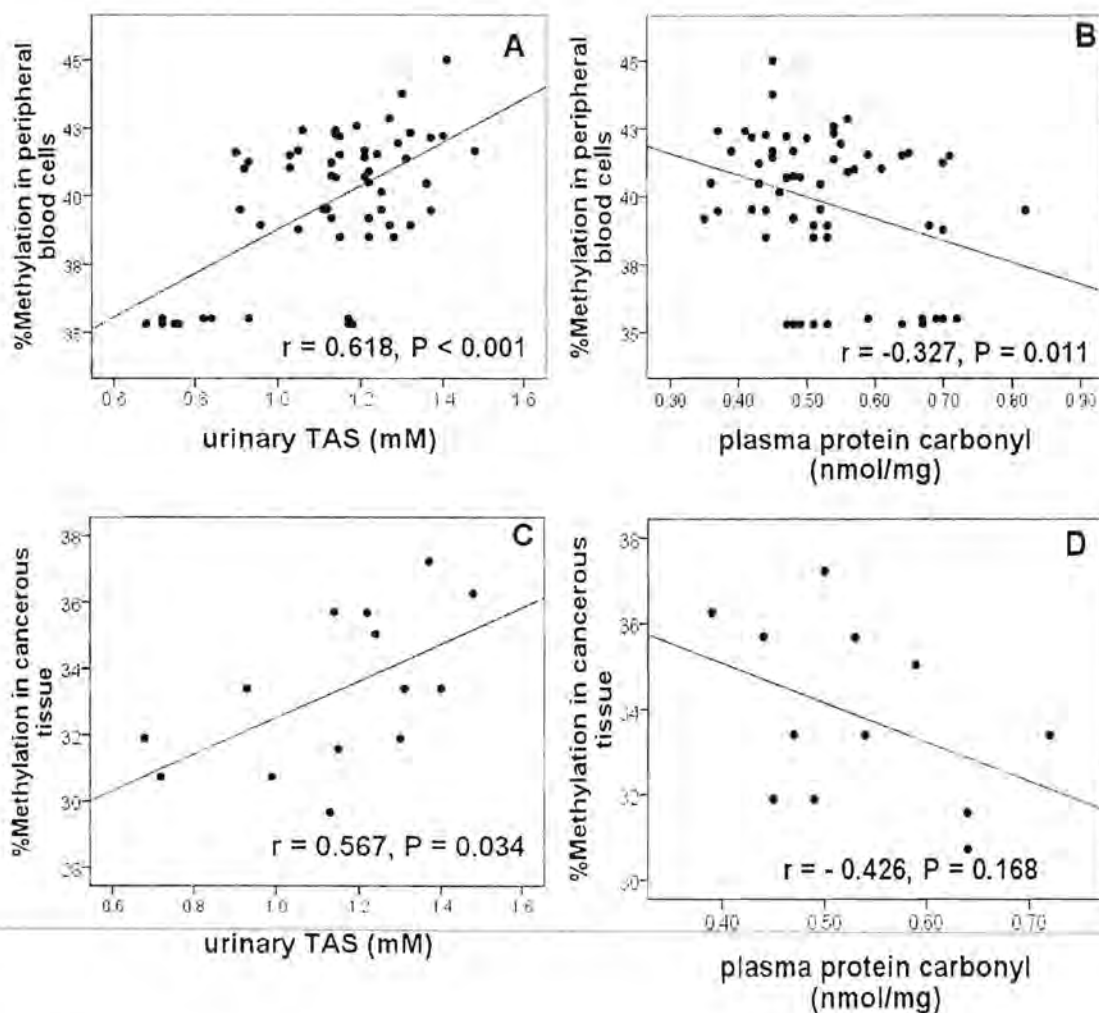
จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยแยกพิจารณาเป็นคู่ตามตารางที่ 8 พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะ ($r = 0.618$, $P < 0.001$) (ภาพ 5A) และสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ($r = -0.327$, $P = 0.011$) (ภาพ 5B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับ methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.567$, $P = 0.034$) (ภาพ 5C) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับ protein carbonyl (ภาพที่ 5D) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะกับระดับ TAS หรือ protein carbonyl (ตารางที่ 2)

จากการศึกษานี้แสดงว่าระดับ methylation ของเซลล์ในเม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์กับระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 5A และภาพที่ 5C) แต่เป็นความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ protein carbonyl (ภาพที่ 5B) นั่นคือภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงสัมพันธ์กับระดับ LINE1 methylation ต่ำ

ตารางที่ 2 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

%Methylation in	urinary TAS (mM ascorbate equivalence)	plasma protein carbonyl (nmol/mg protein)
Peripheral blood cells	$r = 0.618^{**}$ $P < 0.001$ (n = 60)	$r = -0.327^*$ $P = 0.011$ (n = 60)
Urinary exfoliated cells	$r = 0.304$ $P = 0.102$ (n = 30)	$r = 0.086$ $P = 0.102$ (n = 30)
Cancerous tissue	$r = 0.567^*$ $P = 0.034$ (n = 14)	$r = -0.426$ $P = 0.168$ (n = 12)

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test



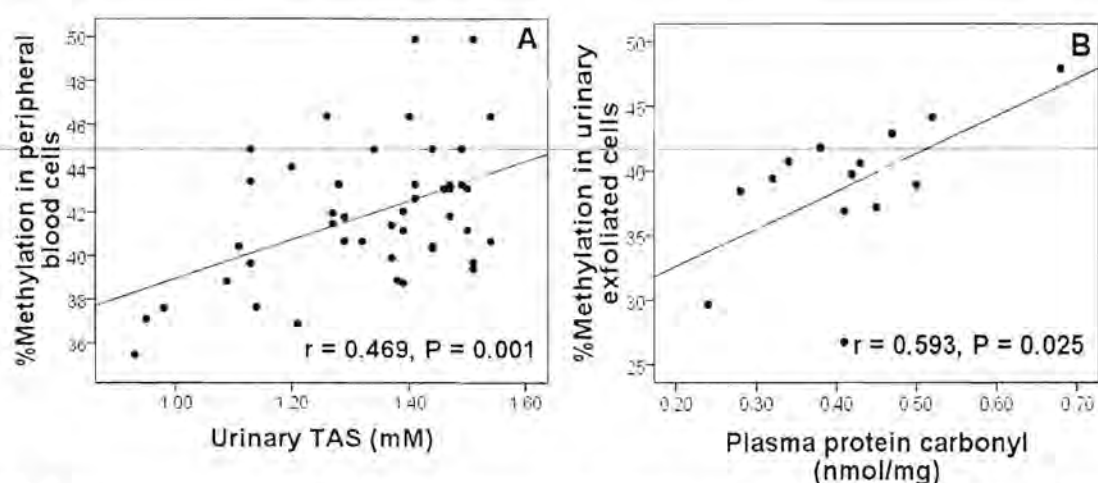
ภาพที่ 5 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ A: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับ TAS ในปัสสาวะ B: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา C: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งและระดับ TAS D: แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ โดยแยกพิจารณาเป็นคู่ตามตารางที่ 3 พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะ ($r = 0.469$, $P = 0.001$) (ภาพ 6A) นอกจากนี้พบว่าระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ($r = 0.593$, $P = 0.025$) (ภาพ 6B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ

%Methylation in	urinary TAS (mM ascorbate equivalence)	plasma protein carbonyl (nmol/mg)
Peripheral blood cells	$r = 0.469^{**}$ $P = 0.001$ (n = 45)	$r = 0.067$ $P = 0.660$ (n = 45)
Urinary exfoliated cells	$r = -0.110$ $P = 0.708$ (n = 14)	$r = 0.593^*$ $P = 0.025$ (n = 14)

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test



ภาพที่ 6 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ A: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาว และระดับ TAS ในปัสสาวะ B: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา

ผลการศึกษาค้นคว้าทางคลินิกในการวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (diagnostic values) ของการตรวจวัด LINE1 methylation และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

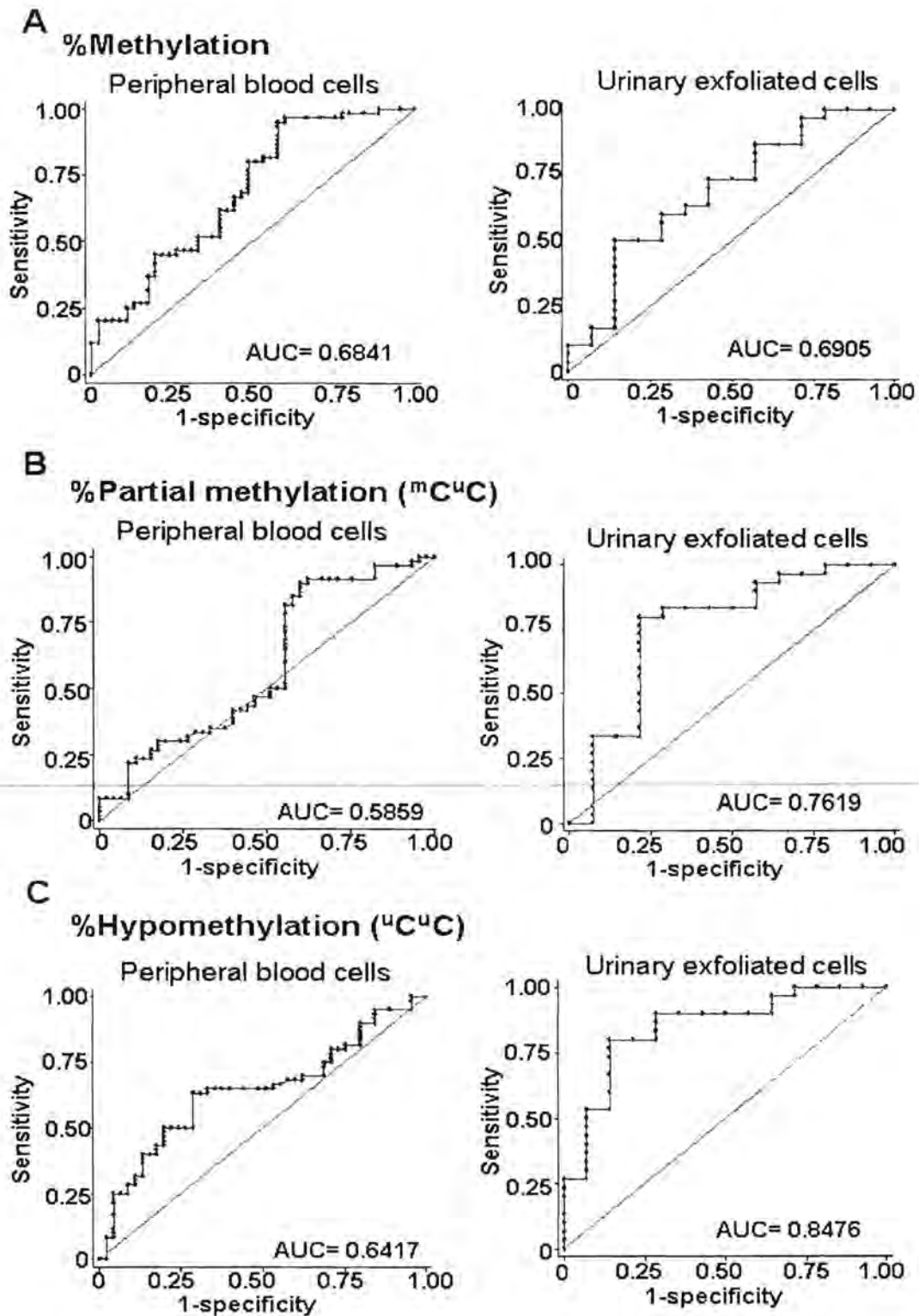
ผลการวิเคราะห์ ROC curve และค่า AUC ของการตรวจวัดแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 10 พบว่าการตรวจวัดระดับ hypomethylation ($^{13}C^{15}N$) (%) ของเซลล์ในปัสสาวะ ให้ค่า AUC ที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.848 (ภาพที่ 23C) มี sensitivity เท่ากับ 80.00% และระดับ specificity เท่ากับ 85.00% ในขณะที่การวัดระดับ LINE1 methylation แบบอื่นๆ ให้ค่า AUC ที่น้อยกว่า แสดงว่าการตรวจวัด

hypomethylated form (${}^u\text{C}^u\text{C}$) สามารถใช้ในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะออกจากคนปกติได้ดีกว่าการตรวจวัด total และ partial methylation

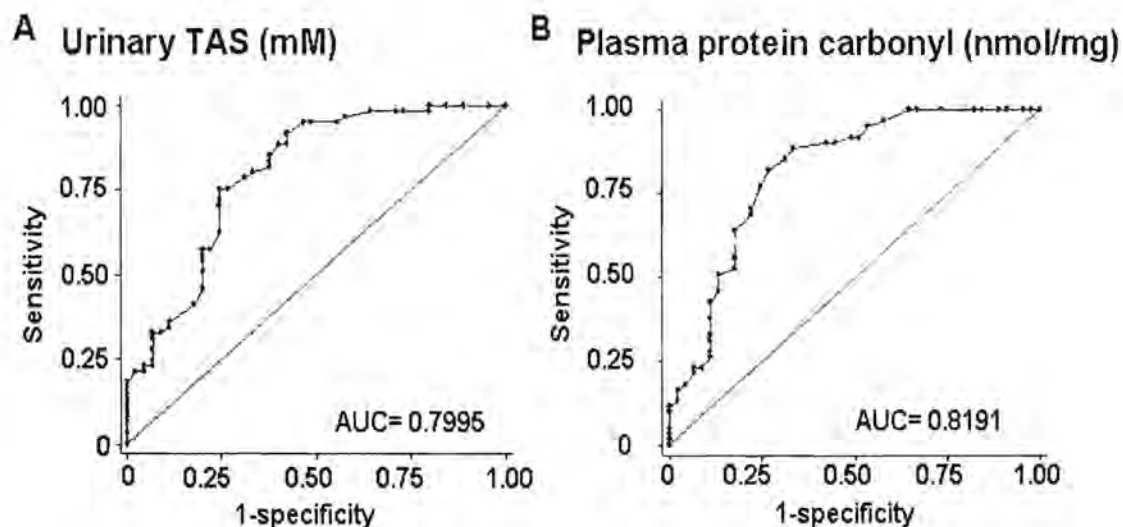
สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางการวินิจฉัยของตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า protein carbonyl ในพลาสมา ให้ค่า AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.819 (ภาพที่ 7B) มีค่า sensitivity เท่ากับ 81.97% และ specificity เท่ากับ 73.33% ขณะที่ AUC ของการตรวจวัด TAS ในปัสสาวะ เท่ากับ 0.800 (ภาพที่ 8A) sensitivity เท่ากับ 88.52% และ specificity เท่ากับ 60.00% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่า area under ROC curve (AUC) ค่า sensitivity และ specificity ของการตรวจวัดระดับ methylation ระดับ partial methylation และ ระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ และการตรวจวัดระดับ TAS ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติ

Samples	Level	ROC			
		AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy of test
Peripheral blood cells (n = 105)	%Methylation Cutoff: 42.87	0.684	96.67	40.00	72.38
	%Partial methylation (${}^m\text{C}^u\text{C}$)Cutoff: 20.96	0.585	91.67	37.78	68.57
	%Hypomethylaiton (${}^u\text{C}^u\text{C}$)Cutoff: 34.64	0.641	50.00	77.78	61.90
Urinary exfoliated cells (n = 44)	%Methylation Cutoff: 42.15	0.691	100.00	21.43	75.00
	%Partial methylation (${}^m\text{C}^u\text{C}$)Cutoff: 22.86	0.762	80.00	71.43	77.27
	%Hypomethylation (${}^u\text{C}^u\text{C}$)Cutoff: 38.43	0.848	80.00	85.00	81.82
Urine (n = 106)	TAS (mM) Cutoff: 1.32	0.800	88.52	60.00	76.42
Plasma (n = 106)	Protein carbonyl (nmol/mg) Cutoff: 0.44	0.820	81.97	73.33	78.30



ภาพที่ 7 แสดง ROC curve ของระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (n=105) และเซลล์ในปัสสาวะ (n = 44) A: ROC curve ของระดับ methylation B: ROC curve ของระดับ partial methylation C: ROC curve ของระดับ hypomethylation มีระดับ sensitivity และระดับ specificity ที่ดีกว่า %methylation



ภาพที่ 8 แสดง ROC curve ของระดับ urinary TAS และระดับ plasma protein carbonyl (nmol/mg) ($n = 106$) A: ROC curve ของระดับ urinary TAS (mM ascorbate equivalence) ($n = 106$) B: ROC curve ของระดับ plasma protein carbonyl (nmol/mg) ($n = 106$)

เนื่องจากมีโอกาสน้อยที่วิธีการทดสอบใดหรือวิธีตรวจเดียวจะมีทั้ง sensitivity และ specificity สูง จึงอาจใช้วิธีทดสอบหรือการตรวจหลายอย่างร่วมกัน (test combination) เพื่อเพิ่มทั้งความไวและความจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้การตรวจร่วมกันแล้ว ถ้าตัดสินการเป็นมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะด้วยระดับ hypomethylation ($^{14}C^{15}C$) ของเซลล์ในปัสสาวะหรือ protein carbonyl ในพลาสมาอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นผลบวก (%hypomethylation or plasma protein carbonyl Positive) จะทำให้เพิ่มความไวของการตรวจขึ้นเมื่อเทียบกับความไวของการตรวจและละอย่าง แต่ถ้าตัดสินมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะเมื่อทั้งระดับ hypomethylation ($^{14}C^{15}C$) ของเซลล์ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมา ให้ผลเป็นบวกทั้งคู่ (%hypomethylation and plasma protein carbonyl Positive) ให้ความจำเพาะรวมกันถึง 96.00% โอกาสที่ผู้ป่วยมีผลบวกเท็จ (false positive) มีเพียง 4.00% เท่านั้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการคำนวณค่า sensitivity และ specificity เมื่อมีการตรวจร่วมสองอย่างเพื่อวินิจฉัยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

Test	Sensitivity	Specificity
Single test		
%Hypomethylation ($^{13}C^{15}C$)	80.00	85.00
Plasma protein carbonyl (nmol/mg)	81.97	73.33
Combined test		
%Hypomethylation or plasma protein carbonyl Positive	96.39	62.33
%Hypomethylation and plasma protein carbonyl Positive	65.58	96.00

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษา พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาี้แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ LINE1 hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ และรูปแบบการเกิด LINE1 methylation ที่พบบ่อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ hypomethylated form หรือ unmethylated pattern หรือ $^{13}C^{15}C$ ซึ่งพบได้สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังให้ค่า AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.848 มี sensitivity เท่ากับ 80.00% และระดับ specificity เท่ากับ 85.00% สามารถใช้ในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะออกจากคนปกติได้ดีกว่าการตรวจวัด total methylation

ผลการศึกษา ระดับ oxidative stress พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ protein carbonyl สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ระดับ total antioxidant status ในปัสสาวะ ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ plasma protein carbonyl ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ด

เลือดขาวที่ต่ำลงสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

มีงานวิจัยจำนวนมากพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (6, 21) โดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันเกิดเนื่องจากการสร้าง ROS ของเซลล์ในร่างกายเพิ่มขึ้น และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ ไขมันและโปรตีน เป็นต้น เมื่อสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ถูกทำลายจะทำให้สูญเสียหน้าที่และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาการบาดเจ็บของโปรตีนจากผลของ ROS หรือ protein oxidation เนื่องจากการศึกษาที่รายงานว่า oxidative damage ต่อโปรตีนมีความสำคัญมากกว่า oxidative damage ต่อไขมัน (15) เพราะเมื่อมีการบาดเจ็บของโปรตีนสะสมมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์สูญเสียการทำงาน ส่งผลให้เซลล์ทำงานผิดปกติจนทำให้เซลล์ตายในที่สุด (40) ซึ่งสารที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของโปรตีนจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ protein carbonyl (41-44) ซึ่งมีการศึกษาหลายงานวิจัยพบว่าระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease (AD)) (45-48) โรคเบาหวาน (diabetes) (49-51) โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease (IBD)) (52) โรคข้ออักเสบ (arthritis) (53, 54) และโรคตับอักเสบชนิด C (hepatitis C) (55) เป็นต้น อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด (56, 57) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับของ protein carbonyl สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (15) แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ ROS ในเลือดสูงกว่าคนปกติ นอกจากนี้ผลการศึกษาระดับของสารต้านออกซิเดชัน โดยการวัดระดับ total antioxidant status (18) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ TAS ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จากการที่ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับอนุมูลอิสระสูงและระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จึงบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ สอดคล้องกับผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ (3) และเป็นที่ยืนยันว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (24, 58, 59)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความสัมพันธ์นี้อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยผู้วิจัยคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไกดังต่อไปนี้ 1) ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เนื่องจากสารอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย โดยการไปออกซิไดซ์เบสกวานีน (guanine) เกิดเป็น 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งเกิดอย่างไม่จำเพาะและมีโอกาสเกิดขึ้นได้ในบริเวณ CpG dinucleotides มีผลไปขัดขวาง

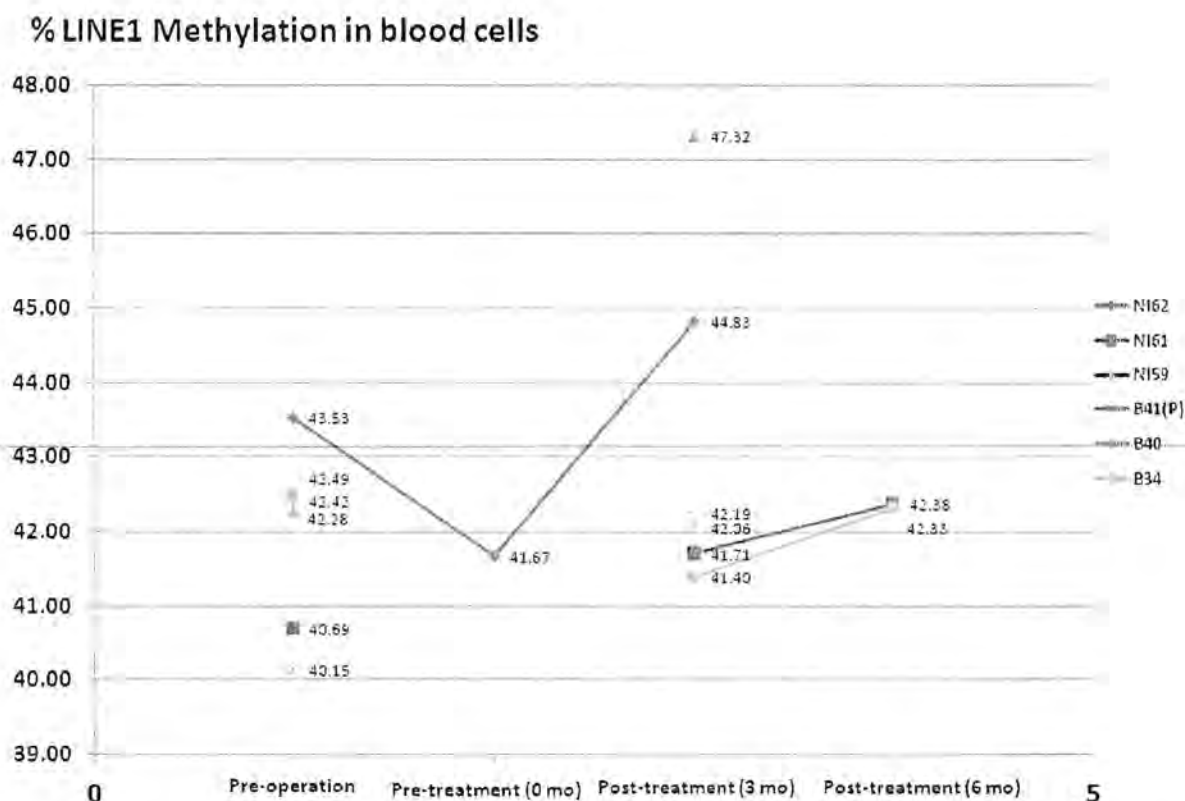
การจับของเอนไซม์ DNMT ในการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกับเบสกวานีนตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น (10, 11) และหาก 8-OHdG ไม่ได้รับการซ่อมแซมที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ G-T transversion ได้ ซึ่งหากเกิดที่บริเวณ CpG dinucleotide จะทำให้มีปริมาณ CpG dinucleotide ลดลง 2) การกำจัดสารอนุมูลอิสระของร่างกาย เนื่องจากเมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือมีปริมาณสารอนุมูลอิสระสูง จะทำให้เซลล์ต้องสร้างกลูตาไทโอน เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการป้องกันความเสียหายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และกลูตาไทโอนก็เป็นกลไกหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งโดยปกติกลูตาไทโอนจะสร้างจากกรดอะมิโน homocysteine ดังนั้นเมื่อมีภาวะ oxidative stress สูงจึงทำให้ปริมาณกรดอะมิโน homocysteine ที่ใช้สร้างกลูตาไทโอนไม่เพียงพอ เซลล์ต้องการ homocysteine เพิ่มมากขึ้น จึงต้องสลาย SAM ที่สร้างมาจากกรดอะมิโน methionine มาเป็น homocysteine แทนและในขณะเดียวกันก็ไม่มี homocysteine เหลือพอที่จะเปลี่ยนกลับไปเป็นกรดอะมิโน methionine จึงส่งผลให้ระดับของ methionine และ SAM ลดลง ทำให้ขาด SAM ที่จะไปใช้ในกระบวนการ DNA methylation ส่งผลจะส่งผลให้เกิด DNA methylation ลดลง (9) มีหลายการศึกษาที่พบว่า การลดลงของ glutathione ทำให้ระดับของ SAM ในเซลล์ลดลงและนำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation (60-62) ซึ่งแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหรือการสร้าง glutathione จากภาวะ oxidative stress มีผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการ DNA methylation โดยการไปเปลี่ยนแปลงปริมาณ SAM ในเซลล์

สรุป ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ LINE1 hypomethylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง ซึ่งพบว่า LINE1 hypomethylation สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น

ตอนที่ 2 ผลการวิจัยการรักษาด้วยขมิ้นชันและมะนาวผงบ่มร่วมกับการปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของภาวะเหนือพันธุกรรมของจีโนมและอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วิธีการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะชนิดฉับพลันที่มีการผ่าตัดเอาออกเฉพาะเนื้อมะเร็ง และเก็บกระเพาะปัสสาวะไว้ จะได้คำแนะนำให้มีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมด้วยตนเองด้วยการสร้างเสริมสุขภาพทุกด้านอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการดูแลแบบองค์รวมทั้งกาย จิต สังคมโดยทีมแพทย์ ได้แก่ การให้คำปรึกษาทางโภชนาการและ การออกกำลังกาย การจัดการความเครียดโดยการนั่งสมาธิ การฝึกยืดกล้ามเนื้อ การเล่นซิ้ง โยคะ ไทเก๊ก การเข้ากลุ่มย่อย พูดคุยกันระหว่างผู้ป่วย และการให้ความรู้และข้อควรระวังต่างๆ อาจป้องกันไม่ให้ก้อนมะเร็งเติบโตหรือยืดระยะเวลาการแพร่กระจายให้ยาวออกไป ทำให้ลดอัตราการเกิดการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซ้ำซ้ำลงได้มาก

ผลจากการศึกษาเบื้องต้นช่วงแรกนี้ โดยศึกษาผลของการรักษาด้วยไขมันชั้นและมะนาว ผงต่อระดับ LINE1 methylation ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 6 คน แบ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับ ไขมันชั้นและมะนาวผลจำนวน 5 คนและผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกจำนวน 1 คน ผลการศึกษาพบว่า ระดับ LINE1 methylation ของผู้ป่วยที่ได้รับไขมันชั้นและมะนาวผงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังอยู่ในระหว่างดำเนินการ ที่จะเพิ่มจำนวนประชากรศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปได้และต้อง ขยายเวลาต่ออีก 6 เดือน



ภาพที่ 9 กราฟแสดงระดับ LINE1 methylation ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับไขมันชั้น และมะนาวผงที่ระยะเวลาต่างกัน จำนวน 5 คน (NI62, NI61, NI59, B40, B41) และผู้ป่วยมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะที่ได้รับยาหลอกจำนวน 1 คน (B41(P))

สรุปถ้าได้ศึกษาผู้ป่วยให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น คณะวิจัยเชื่อว่าหากมีการสร้างเสริม ความรู้ความเข้าใจโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มีการใช้ทั้งไขมันชั้นและมะนาวผง และการปรับเปลี่ยน พฤติกรรมโดยการดูแลตนเอง กินอาหารที่ถูกต้อง น่าจะช่วยลดภาวะเครียดจากออกซีเดชั่นและการทำลาย

ของ DNA จะทำให้ยีนต้านมะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงและทำงานได้ดีขึ้น อาจลดความก้าวหน้าและชะลอการลุกลามของโรคมะเร็ง และ จะส่งผลให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี รวมทั้งเพิ่มอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดยืนยาวขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Kitamura, H.,and Tsukamoto, T. Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. International Journal of Clinical Oncology.11,1(2006): 28-37.
- [2] Bravaccini, S., Casadio, V., Amadori, D., Callistri, D.,and Silvestrini, R. The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India.25,1(2009): 40.
- [3] Wayakkanont, U., et al. Efficacy of combined treatment between lime powder and curcumin supplementation on reduction of superficial bladder cancer recurrence: A preliminary randomized controlled trial. Chulalongkorn Medical Journal.53,3(2009): 199-214.
- [4] Augustine, A., Hebert, J.R., Kabat, G.C.,and Wynder, E.L. Bladder cancer in relation to cigarette smoking. Cancer research.48,15(1988): 4405.
- [5] Mitra, A.P.,and Gote, R.J. Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. Nature Reviews Urology.7,1(2010): 11-20.
- [6] Choi, S.H., et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. International journal of cancer.125,3(2009): 723-9.
- [7] Ting Hsiung, D., et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.16,1(2007): 108.
- [8] Chalitchagorn, K., et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene.23,54(2004): 8841-6.
- [9] Hitchler, M.J.,and Domann, F.E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Free Radical Biology and Medicine.43,7(2007): 1023-36.
- [10] Weitzman, S.A., Turk, P.W., Milkowski, D.H.,and Kozlowski, K. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.91,4(1994): 1261.

- [11] Turk, P.W., Laayoun, A., Smith, S.S., and Weitzman, S.A. DNA adduct 8-hydroxyl-2 - deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. Carcinogenesis.16,5(1995): 1253.
- [12] Kazazian, H.H., and Moran, J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nature Genetics.19,1(1998): 19-24.
- [13] Lander, E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature.409,6822(2001): 860-921.
- [14] Wilhelm, C.S., et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. Clinical Cancer Research.16,5(2010): 1682.
- [15] Yılmaz, İ.A., Akay, T., Akatay, U., Telci, A., Atas, S., and Yalın, V. Relation between bladder cancer and protein oxidation. International urology and nephrology.35,3(2003): 345-50.
- [16] Jemal, A., et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians.58,2(2008): 71.
- [17] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians.55,2(2005): 74-108.
- [18] Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Sriplung, H., Wiangnon, S., Sumitsawan, Y., and Attasara, P. Cancer in Thailand Vol. IV, 1998-2000. Bangkok: Ministry of Public Health, Ministry of Education; 2007.
- [19] Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Malvezzi, M., and La Vecchia, C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. Nature Clinical Practice Urology.3,6(2006): 327-40.
- [20] Ward, E.M., et al. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. Journal of the National Cancer Institute.88,15(1996): 1046.
- [21] Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. Journal of Biological Chemistry.272,34(1997): 20963.
- [22] Furukawa, S., et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest.114,12(2004): 1752-61.
- [23] Marshall, P.J., Warso, M.A., and Lands, W.E.M. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. Analytical biochemistry.145,1(1985): 192-9.

- [24] Kadlubar, F.F., Butler, M.A., Kaderlik, K.R., Chou, H.C., and Lang, N.P. Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. Environmental health perspectives.98(1992): 69.
- [25] Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation Research/Reviews in Mutation Research.567,1(2004): 1-61.
- [26] Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis.21,3(2000): 361.
- [27] Moriya, M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC--> TA transversions in simian kidney cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.90,3(1993): 1122.
- [28] Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G., and Panayiotidis, M.I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer letters.266,1(2008): 6-11.
- [29] Klaunig, J., Kamendulis, L., and Xu, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. Human & experimental toxicology.19,10(2000): 543.
- [30] Sassaman, D.M., et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. Nature Genetics.16,1(1997): 37-43.
- [31] Wachsman, J.T. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.375,1(1997): 1-8.
- [32] Hepburn, P., Margison, G., and Tisdale, M. Enzymatic methylation of cytosine in DNA is prevented by adjacent O6-methylguanine residues. Journal of Biological Chemistry.266,13(1991): 7985.
- [33] Tan, N.W., and Li, B.F.L. Interaction of oligonucleotides containing 6-O-methylguanine with human DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. Biochemistry.29,39(1990): 9234-40.
- [34] Xiao, W., and Samson, L. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.90,6(1993): 2117.
- [35] Christman, J.K., Sheikhnejad, G., Marasco, C.J., and Sufirin, J.R. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.92,16(1995): 7347.

[36] Levine, R., Williams, J., Stadtman, E.,and Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in enzymology.233(1994): 346-57.

[37] Janaszewska, A.,and Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scandinavian journal of clinical & laboratory investigation.62,3(2002): 231-6.

[38] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry.72,1-2(1976): 248-54.

[39] Pobsook, T., Subbalekha, K., Sannikorn, P.,and Mutirangura, A. Improved measurement of LINE-1 sequence methylation for cancer detection. Clinica Chimica Acta. 2010).

[40] Dean, R., Fu, S., Stocker, R.,and Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochemical Journal.324,Pt 1(1997): 1.

[41] Berlett, B.S.,and Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Journal of Biological Chemistry.272,33(1997): 20313.

[42] Chevion, M., Berenshtein, E.,and Stadtman, E. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. Free radical research.33(2000): S99.

[43] Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples 1*. Drug metabolism reviews.32,3-4(2000): 307-26.

[44] Beal, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free radical biology & medicine.32,9(2002): 797.

[45] Smith, C., et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.88,23(1991): 10540.

[46] Conrad, C.C., Marshall, P.L., Talent, J.M., Malakowsky, C.A., Choi, J.,and Gracy, R.W. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. Biochemical and biophysical research communications.275,2(2000): 678-81.

[47] Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D., Geddes, J.,and Markesbery, W. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. Neuroscience.103,2(2001): 373-83.

- [48] Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Conrad, C.C., and Gracy, R.W. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease* 1. Biochemical and biophysical research communications.293,5(2002): 1566-70.
- [49] Grattagliano, I., Vendemiale, G., Boscia, F., Micelli-Ferrari, T., Cardia, L., and Altomare, E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. Free Radical Biology and Medicine.25,3(1998): 369-72.
- [50] Dom nguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., and Carrascosa, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. Diabetes care.21,10(1998): 1736.
- [51] Telci, A., akatay, U., Salman, S., Satman, I., and Sivas, A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. Diabetes research and clinical practice.50,3(2000): 213-23.
- [52] Lih-Brody, L., et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. Digestive diseases and sciences.41,10(1996): 2078-86.
- [53] Mantle, D., Falkous, G., and Walker, D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. Clinica Chimica Acta.284,1(1999): 45-58.
- [54] Renke, J., Popadiuk, S., Korzon, M., Bugajczyk, B., and Wozniak, M. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. Free Radical Biology and Medicine.29,2(2000): 101-4.
- [55] De Maria, N., et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. Free Radical Biology and Medicine.21,3(1996): 291-5.
- [56] Popadiuk, S., Korzon, M., and Renke, J. Carbonyl groups content on the basis of protein peroxidation analysis with total antioxidant status in blood of children with cancers. Wiadomo ci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960).51(1998): 107.
- [57] Pignatelli, B., et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. Cancer research.61,2(2001): 778.
- [58] Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H., and Murai, M. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. British journal of cancer.76,2(1997): 206.

- [59] Brown, N., Streeter, E., Jones, A., Harris, A., and Bicknell, R. Cooperative stimulation of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and reactive oxygen species: the effect of targeting vascular endothelial growth factor and oxidative stress in an orthotopic xenograft model of bladder carcinoma. British journal of cancer.92,9(2005): 1696-701.
- [60] Lertratanangkoon, K., Savaraj, N., Scimeca, J.M., and Thomas, M.L. Glutathione depletion-induced thymidylate insufficiency for DNA repair synthesis. Biochemical and biophysical research communications.234,2(1997): 470.
- [61] Lertratanangkoon, K., Orkiszewski, R.S., and Scimeca, J.M. Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion. Cancer research.56,5(1996); 995.
- [62] Lertratanangkoon, K., Wu, C.J., Savaraj, N., and Thomas, M.L. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. Cancer letters.120,2(1997): 149-56.
-