สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2071921265

กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

กระบวนการเหนือพันธุกรรม คือ เป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ไม่ขึ้นกับลำดับเบสบนดีเอ็นเอ แต่เกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ เช่น การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) การปรับแต่งโปรตีนฮิสโตน (histone modification) การจัดตำแหน่งของนิวคลีโอโซม (nucleosome positioning) และ การแสดงออกของ non-coding RNAs ซึ่งสามารถเกิดขึ้นใหม่และสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ กลไกเหนือยีนเหล่านี้จะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส (transcriptional control) โดยพบว่าสามารถมีความแตกต่างกันได้ในแต่ละเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ และอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามระยะเวลาหรืออายุของเซลล์

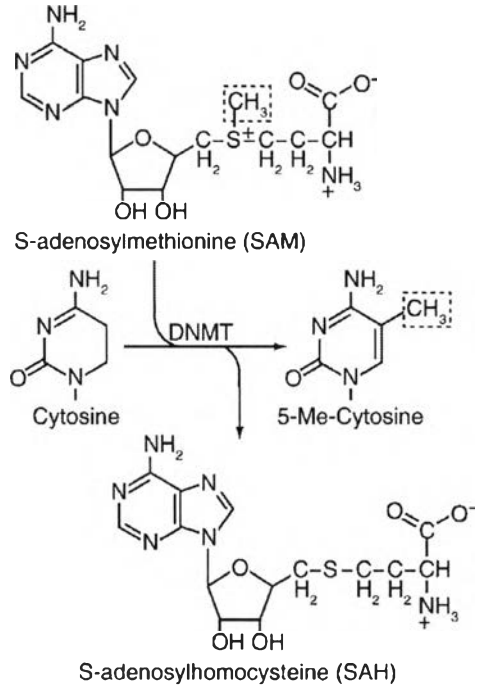
การศึกษาความผิดปกติของกระบวนการเหนือพันธุกรรมที่นิยมศึกษากันมากที่สุดคือ DNA methylation โดยจากรายงานที่ผ่านมาพบว่า ความผิดปกติของ DNA methylation มีความสัมพันธ์กับโรคหลายชนิด เช่น โรคทางระบบประสาท โรคเบาหวานชนิดที่ 2 รวมไปถึงโรคมะเร็งชนิดต่างๆ (16-18)

การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation)

DNA methylation คือ กลไกสำคัญการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน DNA แต่อาศัยการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ ในตำแหน่งที่เรียกว่า CpG dinucleotide คือบริเวณที่เบส cytosine (C) อยู่ต่อกับเบส guanine (G) ในจีโนมของมนุษย์ จะมีบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ CpG อยู่เป็นจำนวนมาก เรียกว่า CpG island และเมื่อมีการเติมหมู่เมทิล ที่บริเวณนี้แล้ว จะทำให้กดการแสดงออกของยีนบริเวณนั้น โดยส่วนใหญ่การเกิด DNA methylation เกิดขึ้นเพื่อลดการแสดงออกของ repetitive elements และ transposons ในขณะที่ CpG บริเวณ promoter มักจะ unmethylated เพื่อให้ยีนสามารถแสดงออกได้ (1, 3) กลไกในการกดการแสดงออกของยีนโดยการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ เกิดจากหมู่เมทิลที่เติมบนดีเอ็นเอ ขวางอยู่ในตำแหน่ง major groove ของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ transcription factor เข้าจับ ดังนั้น transcription factor ต่างๆ เช่น c-Myc/Myn, CREB/ATF, E2F เป็นต้น ไม่สามารถเข้าจับและไม่สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้ ทำให้ไม่สามารถเกิดการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) อีกกลไกที่สำคัญคือ เมื่อมีการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอเกิดขึ้นแล้ว จะส่งผลให้โปรตีนที่ทำหน้าที่ระลึกและจับกับหมู่เมทิล คือ methyl-CpG binding domain (MBDs) สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ ภายหลังการ

จับกันของ DNA และ MBD protein จะส่งผลให้เกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน จาก euchromatin เป็น heterochromatin จึงไม่สามารถเกิดการถอดรหัสพันธุกรรมได้ (19)

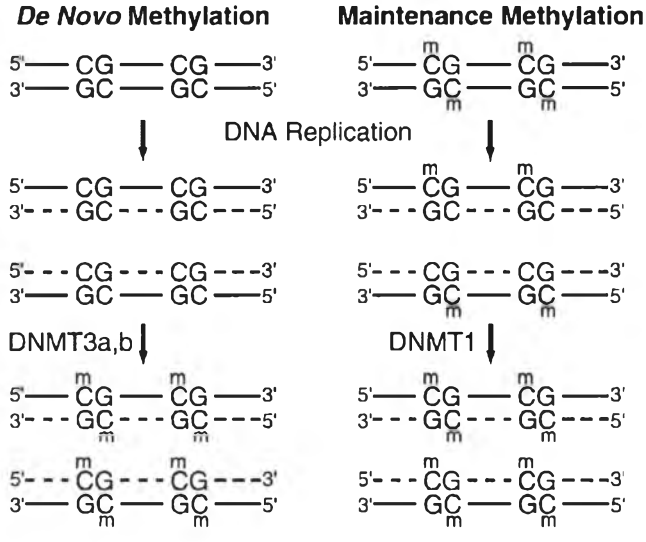
ปฏิกิริยา DNA methylation อาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) โดยใช้ SAM เป็นตัวให้หมู่เมทิลกับนิวคลีโอไทด์ชนิด C ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 บนวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5-mC) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะทำให้ SAM ถูกเปลี่ยนเป็น SAH



ภาพที่ 1 แสดงกลไกปฏิกิริยา DNA methylation โดยการย้ายหมู่เมทิลจาก SAM ไปเติมคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส C อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNMT เกิดเป็น 5-mC และ SAM จะถูกเปลี่ยนเป็น SAH (20)

เอนไซม์ DNMT ที่เร่งปฏิกิริยา DNA methylation มี 3 isozymes ได้แก่ DNMT1, DNMT3A และ DNMT3B โดยแต่ละ isozymes ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้แก่ cytosine เช่นเดียวกัน แต่จะมีบทบาทในสถานการณ์ที่แตกต่างกันไป โดย DNMT1 มีบทบาทในการรักษาการเติมหมู่เมทิลให้คงเดิม (maintenance DNMT) เมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัวดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะยังไม่มีการเติมหมู่เมทิล จึงต้องอาศัย DNMT1 เป็นตัวเติมหมู่เมทิลให้แก่ดีเอ็นเอสายใหม่นี้ โดยจดจำตำแหน่งหมู่เมทิลที่จำเพาะของดีเอ็นเอสายคู่สม นอกจากนั้นยังรวมถึงกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing) ดีเอ็นเอสายใหม่ก็ต้องอาศัย DNMT1 ในการเติมหมู่เมทิลด้วยเช่นกัน สำหรับ DNMT3A และ DNMT3B มีบทบาทในการเติมหมู่เมทิลใหม่ (*de novo* methylation) โดยไม่ต้องอาศัยหมู่

เมทิลที่มีอยู่เดิมบนดีเอ็นเอคู่สมเหมือน DNMT1 แต่สามารถทำการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอได้เนื่องจากสามารถจับได้ดีกับ unmethylated CpG (K_m ต่ำ) ด้วยเหตุนี้ DNMT3A และ DNMT3B น่าจะถูกเหนี่ยวนำด้วยสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การสูบบุหรี่, การสัมผัสยาหรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืช, ภาวะทุพโภชนา หรือภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เป็นต้น



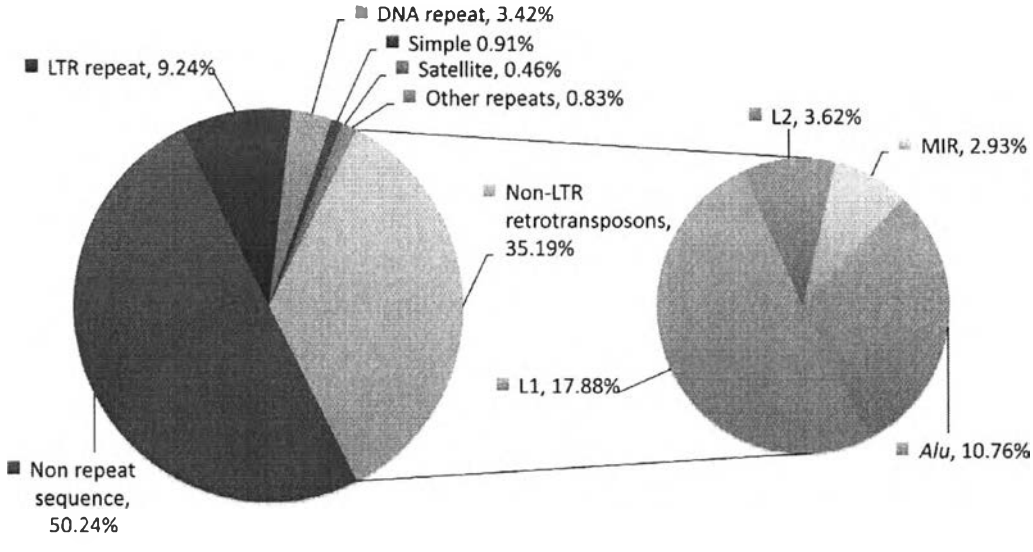
ภาพที่ 2 แสดงปฏิกิริยา DNA methylation ได้แก่ de novo DNA methylation ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNMT3A และ 3B ในการเติมหมู่เมทิลให้กับ unmethylated CpG และ maintenance DNA methylation ที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNMT1 ในการเติมหมู่เมทิลให้กับ hemimethylated CpG (20)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความผิดปกติของ DNA methylation สามารถพบได้ในหลายโรค อาทิ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน และที่นิยมศึกษากันมากที่สุดคือโรคมะเร็ง โดยจากรายงานพบว่า ความผิดปกติของ DNA methylation ในมะเร็ง ซึ่งความผิดปกติของการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (aberrant DNA methylation) ในปัจจุบันถูกใช้เป็นหนึ่งใน molecular hallmark ของการเกิดมะเร็ง ความผิดปกติของการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอที่พบในเซลล์มะเร็งแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ 1) genome-wide hypomethylation ซึ่งจะพบการลดลงของการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอในส่วนของ repetitive sequences และ transposable elements ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่นิยมศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวแทนของระดับ genome-wide DNA methylation คือ Long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1) เนื่องจาก LINE-1 มีการกระจายอยู่ทั่วไปทั้งจีโนม จากหลายรายงานวิจัยพบว่า LINE-1 hypomethylation มีความสัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิด และ 2) regional (site-specific CpG island promoter) hypermethylation ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเติม

2071921265

หมู่เมทิลบนดีเอ็นเอของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เช่น p53, PTEN เป็นต้น ส่งผลให้ยีนต้านมะเร็งมีการแสดงออกที่น้อยลง (7, 21)

ในจีโนมมนุษย์ ประมาณครึ่งหนึ่งเป็น non repeat sequence เช่น ยีนต่างๆ ส่วนที่เหลือกว่าครึ่งเป็น repetitive elements โดยในส่วนของ repetitive sequence นี้ องค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ LINE-1, L2, Mammalian Interspersed Repetitive (MIRs) และ Alu elements โดย LINE-1 และ Alu ยังเป็นส่วนที่ยังคงทำงานอยู่ในจีโนมและเป็นสาเหตุของการเกิด genetic polymorphisms



ภาพที่ 3 แสดงองค์ประกอบของ human genome

2071921265

Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1)

LINE-1 เป็น retro viral intragenomic endoparasitic element ที่พบได้มากถึง 5 แสนซ้ำ หรือประมาณ 17% ของ human genomic DNA ขนาดของ LINE-1 อาจแตกต่างกันไปขึ้นกับกระบวนการจำลองตัวและการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น full-length LINE-1 มีขนาดประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 5'-UTR (untranslated region) ที่มี promoter สำหรับการเข้าจับของ RNA polymerase II enzyme (รูปที่ 6) และ Open reading frame (ORF) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ORF1 ซึ่งทำหน้าที่ในการถอดรหัส nucleic acid-binding protein และ ORF2 ซึ่ง encode โปรตีนที่มี 2 domains คือ endonuclease และ reverse transcriptase และส่วนสุดท้ายคือ 3'-UTR มีลักษณะเป็นช่วงเบสที่มีลำดับซ้ำกัน (poly A) มีคุณสมบัติเป็น retrotransposon คือสามารถเกิด replication เพื่อจำลองตัวเองแล้วแทรกชิ้นส่วนที่จำลองขึ้นมาไปบนส่วนต่างๆ ของจีโนมได้ ซึ่งเป็นสาเหตุเริ่มต้น

ของการเกิดมะเร็ง เพราะทำให้เกิดความไม่เสถียรของโครโมโซม (chromosome instability) รวมไปถึงเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (chromosomal rearrangement)

เนื่องด้วยคุณสมบัติที่ LINE-1 กระจายตัวอยู่มากในจีโนมมนุษย์จึงนำมาใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ global DNA methylation (1, 3) ซึ่งการวิเคราะห์จากการเติมหมู่เมทิลโดยใช้ LINE-1 เป็นตัวแทน เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยกว่าการวิเคราะห์ทุกนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลจาก LINE-1 นั้น จะใช้ปฏิกิริยาเคมีของ bisulfite ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ cytosine ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลแล้วได้ (ภาพที่ 11) จากนั้นจะใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีต่างๆต่อไป แต่สำหรับการวิเคราะห์ทุกนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย chromatography หรือวิเคราะห์ด้วยการใช้ DNA methyltransferase ควบคู่กับ SAM ที่ติดสารกัมมันตรังสี เพื่อดูปริมาณสารกัมมันตรังสีที่จะเพิ่มเข้าไปภายหลังในดีเอ็นเอที่ยังไม่ถูกเติมหมู่เมทิลมาก่อน (22) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลามาก มีหลายขั้นตอน และใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก

2071921265

จากรายงาน ของ Chalitchagorn และคณะ ในปี 2004 ที่ศึกษาระดับและรูปแบบ LINE-1 methylation ด้วยเทคนิค COBRA-PCR พบว่าการเกิด LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้, มะเร็งปอด, มะเร็งตับ รวมทั้งมะเร็งกระเพาะอาหาร เป็นต้น เนื้อเยื่อมะเร็งมีระดับการเกิด methylation ต่ำกว่าเนื้อเยื่อปกติ นอกจากนั้นยังพบระดับ methylation แตกต่างกันมะเร็งแต่ละชนิด (6)

ภาพที่ 4 แสดงส่วนประกอบของ Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1 or L1) มีความยาว ~6 kb ที่บริเวณ 5'-UTR มีส่วนของ RNA polymerase II promoter, ถัดจาก 5'-UTR ประกอบด้วย 2 open reading frames (ORF1 and ORF2) และ 3'-UTR ที่มีปลาย poly(A) tail (23)

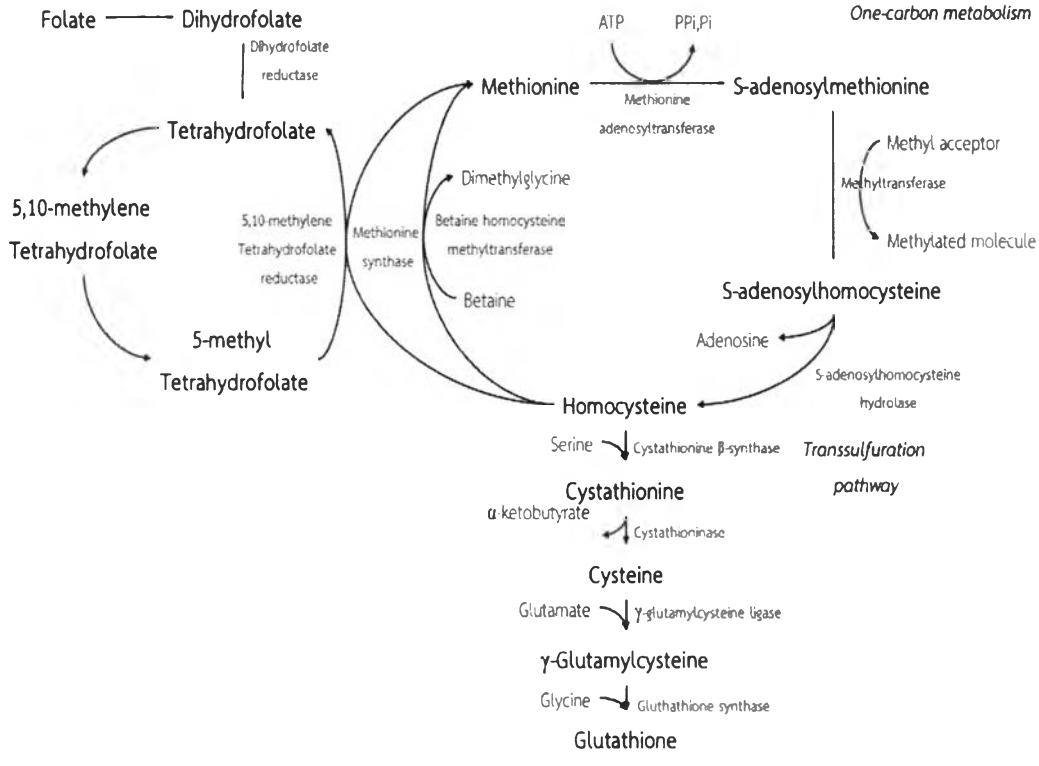
นอกจาก LINE-1 แล้ว ยังมีการใช้ Alu repeats ซึ่งเป็น transposon ที่กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมมนุษย์มาวัด global methylation โดยใช้หลักการเช่นเดียวกับ LINE-1 ในการประเมินการเติมหมู่เมทิล ซึ่งทั้ง LINE-1 และ Alu ก็สามารถใช้เป็นตัวแทนในการประเมิน genome-wide methylation ได้เป็นอย่างดี (3)

วิถี One-carbon metabolism และ Transsulfuration

ปฏิกิริยาการเกิด methylation ในเซลล์ อาศัยการย้ายหมู่เมทิล (CH_3-) จากตัวให้หมู่เมทิล SAM ที่ได้มากจากการสร้างในวิถี one-carbon metabolism โดยในวิถีนี้ จะใช้ methionine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นและ Adenosine triphosphate (ATP) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ SAM อาศัยการทำงานของเอนไซม์ methionine adenosyl transferase (MAT) ในการย้ายหมู่ adenosyl จาก ATP ให้ methionine เกิดเป็น SAM ที่พร้อมทำหน้าที่เป็นให้หมู่เมทิล ในการย้ายหมู่เมทิลไปให้สารชีวโมเลกุลต่างๆ โดยการทำงานของเอนไซม์ methyltransferase ซึ่งสำหรับ DNA methylation จะใช้เอนไซม์ DNMT ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ภายหลังการเกิด methylation แล้ว SAM จะถูกเปลี่ยนเป็น SAH ซึ่งจะถูก hydrolyzed โดยเอนไซม์ SAH hydrolase (SAHH) เกิดเป็น Hcy และ adenosine ซึ่งปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ (reversible reaction) Hcy ที่เกิดขึ้นนั้น จะถูกเปลี่ยนกลับเป็น methionine เพื่อใช้ใน one-carbon metabolism อีกครั้งโดยเอนไซม์ methionine synthase ซึ่งมี vitamin B_{12} เป็น co-factor และมี 5-methyltetrahydrofolate (5-methyl-THF) เป็นสารตั้งต้น (24) (ภาพที่ 5)

แต่อย่างไรก็ตาม Hcy ที่เกิดขึ้นใน one-carbon metabolism สามารถถูก metabolite โดย transsulfuration pathway อาศัยการทำงานของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase (CBS) เกิดเป็น cystathionine และเปลี่ยนเป็น cysteine (Cys) โดยเอนไซม์ cystathionine-γ-lyase (CGL) หลังจากนั้นจะมีการเติม Glutamate (Glu) เข้ากับ Cys อาศัยเอนไซม์ glutamate cysteine ligase (GCL) สุดท้ายคือการเชื่อม Glycine เข้ากับ γ-Glutamylcysteine โดยเอนไซม์ glutathione synthase เกิดเป็น Glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักของเซลล์

2071921285



2071921265

ภาพที่ 5 แสดงวิถี one-carbon metabolism และ transsuluration โดย one-carbon metabolism ทำหน้าที่สังเคราะห์ SAM รวมถึง Hcy ถึงเป็นจุดเชื่อมต่อกับ transsulfuration pathway ที่ใช้ Hcy เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ glutathione (ดัดแปลงจาก Lu S.C., 2000)(24)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (Oxidative stress)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ มักเกิดจากการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ หรือมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด สารอนุมูลอิสระมีแหล่งกำเนิดมาจากทั้งภายในเซลล์ (endogenous source) เช่น ใน mitochondria และ peroxisome และผลิตจากเซลล์ในกระบวนการอักเสบ เป็นต้น และจากภายนอกร่างกาย เช่น การได้รับสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม (environmental agent) ยา รวมถึงสารเคมีในอุตสาหกรรม (ภาพที่ 7) โดยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้น จะส่งให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน รวมไปถึงดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลในด้านโครงสร้างและการทำหน้าที่ให้เกิดความผิดปกติไป ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมตามมา อาทิ genetic mutation และ chromosome instability เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (malignant transformation) (11, 13, 25, 26)

ในภาวะปกติ เซลล์จะมีการสร้างพลังงานโดยอาศัยออกซิเจน (aerobic metabolism) เกิดขึ้นใน mitochondria metabolism มีการส่งผ่านอิเล็กตรอนและมีออกซิเจนมาเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ซึ่งในกระบวนการนี้ อาจทำให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ได้ โดยเฉพาะ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) และสามารถเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยเอนไซม์ superoxide dismutase และ H_2O_2 ยังสามารถถูกเปลี่ยนเป็น hydroxyl radical ได้ อาศัย Fenton reaction (ภาพที่ 6) โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลภายในเซลล์และเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ในการเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าว จะสามารถหยุดได้ โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งมีทั้งที่สร้างภายในเซลล์ เช่น glutathione (GSH), catalase, superoxide dismutase เป็นต้น หรือได้รับจากภายนอกเซลล์ เช่น Vitamin E, Vitamin C เป็นต้น (27)

จากรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง oxidative stress และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดย Honglertsakul และคณะ (28) พบว่าระดับ 8-OHdG และ malondialdehyde (MDA) ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของ oxidative damage ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงรายงานของ Akcay และคณะ (29) ยังพบว่า 8-OHdG ในเม็ดเลือดขาวมีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วยเช่นกัน แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ ดังนั้นการยับยั้ง oxidative stress ด้วย antioxidants น่าจะเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ เช่นงานวิจัยของ Liang และคณะ (30) พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ α-tocopherol ในพลาสมาต่ำกว่าคนปกติ

Reduction of Molecular Oxygen

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ (Superoxide anion)

$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot}$ (Hydroperoxyl radical)

$HO_2^{\cdot} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$ (Hydrogenperoxide)

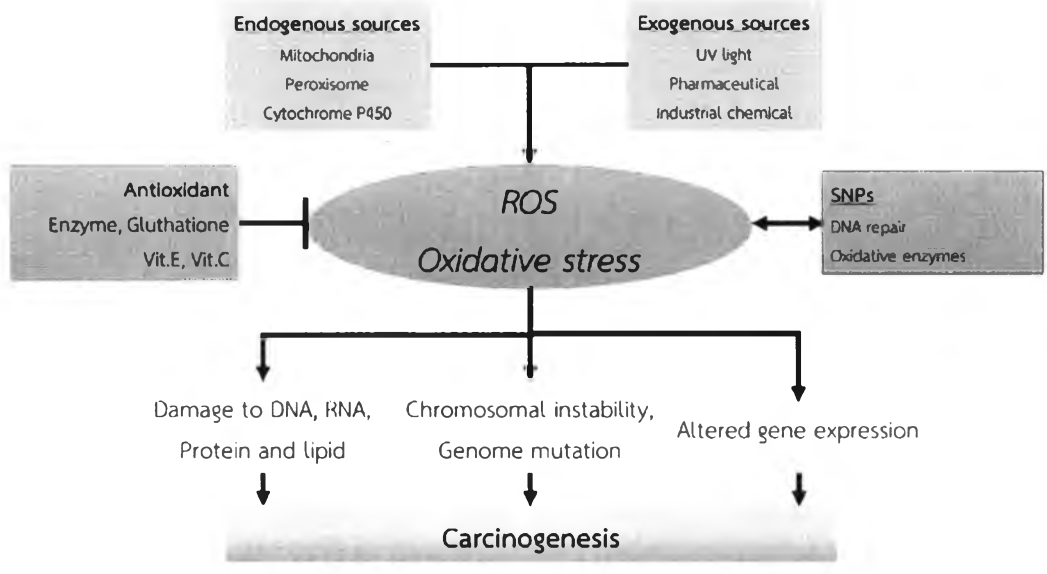
$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^{\cdot}$ (Hydroxyl radical)

Fenton Reaction

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$

ภาพที่ 6 แสดงปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยปฏิกิริยา one-electron reduction of molecular oxygen และ Fenton reaction (12)

2071921265

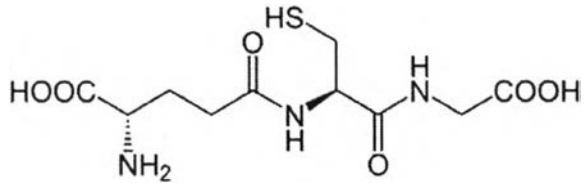


ภาพที่ 7 แสดงภาพรวมของ ROS ต่อการเกิดมะเร็ง (12)

2071921265

ความสัมพันธ์ระหว่าง oxidative stress และ DNA methylation

ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เซลล์มีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยอาศัย glutathione ซึ่งเป็น cellular antioxidant ที่สำคัญ ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น จะส่งผลให้เกิดการ up-regulation ของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase ให้มี activity เพิ่มสูงขึ้น (31) ทำให้มีการเปลี่ยน Hcy จาก methionine cycle ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น cystathionine และ cysteine ตามลำดับ ในวิถี transsulfuration pathway (ภาพที่ 5) สุดท้ายได้ glutathione เพื่อใช้กำจัดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งจากปฏิกิริยาดังกล่าว จะเห็นได้ว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ส่งผลโดยตรงกับ methionine cycle หรือ one-carbon metabolism pathway โดยการดึง homocysteine ใน methionine cycle เพื่อออกมาใช้ในการสร้าง glutathione ทำให้ปริมาณ methionine ที่จะนำไปสร้าง SAM มีปริมาณลดลง ทำให้ methyl donor ในปฏิกิริยา methylation ต่างๆลดลง รวมไปถึงปฏิกิริยา DNA methylation ด้วย ซึ่งจากรายงานวิจัยของมธุรดาและคณะ ในปี 2012 (14) พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งมักมีภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูงกว่าคนปกติ และสัมพันธ์กับการเกิด LINE-1 hypomethylation อีกด้วย จากรายงานของ Niedzwiecki และคณะ ในปี 2013 (10) พบว่า ในผู้ใหญ่ที่มีระดับ glutathione ในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับการเกิด global hypomethylation จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ รวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วย ดังนั้นหากสามารถขจัดสารอนุมูลอิสระ ด้วยการให้สารต้านอนุมูลอิสระแก่เซลล์ น่าจะสามารถช่วยลด global hypomethylation และลดโอกาสการเกิดมะเร็งได้



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของกลูตาไธโอน

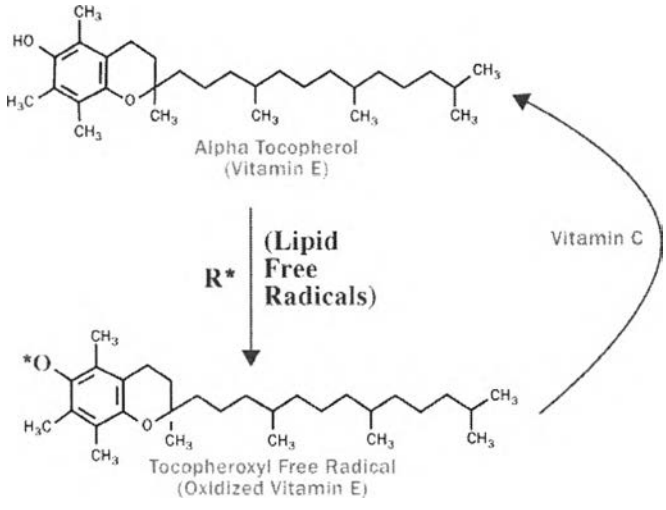
(http://www.bio.davidson.edu/people/kabernd/berndcv/lab/website%20(summer%202009)/lshhomepage/lshmain.htm)

วิตามินอี

วิตามินอีเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย หน้าที่หลักของวิตามินอีในร่างกายคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่เกิดที่ไขมัน

วิตามินอี ซึ่งเป็นวิตามินที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่เยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสาร lipophilic ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยา lipid peroxidation ภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น การเกิดอนุมูลอิสระในไขมันนั้นจะเริ่มจากการเกิดอนุมูลอิสระที่อะตอมของคาร์บอน (carbon-centered radical) จากนั้นคาร์บอนอะตอมนี้จะเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็น peroxyl radical จากนั้นจะทำปฏิกิริยากับไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) เกิดเป็น hydroperoxide และได้อนุมูลอิสระเกิดใหม่อีก 1 โมเลกุล ซึ่งจะกลับไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ใหม่ วนเป็นวัฏจักรต่อไป ซึ่งวิตามินอีนั้นมีคุณสมบัติเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีจากการรับอิเล็กตรอนอิสระเข้ามาในโครงสร้าง แล้วใช้คุณสมบัติ resonance เป็นตัวลดความว่องไวของอิเล็กตรอนอิสระ ก่อนที่จะกำจัดอิเล็กตรอนอิสระนี้ต่อไป (ภาพที่ 9)

มีการศึกษาพบว่าวิตามินอีมีส่วนยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ นอกจากนั้นยังมีรายงานที่พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ทานวิตามินอีเป็นประจำ สามารถลดอัตราเสี่ยงและลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และยังมีรายงานที่พบว่าวิตามินอีไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งอีกด้วย ดังนั้นการให้วิตามินอี จึงน่าจะเป็นผลดีกับเซลล์กับการป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ โดยวิตามินอีที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูป α-tocopherol ซึ่งเป็นรูปที่พบได้มากที่สุดและมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม α-tocopherol เป็นวิตามินอีในรูปที่ไม่เสถียร สามารถสลายตัวได้ง่าย จึงไม่สะดวกในการเก็บรักษาและนำมาใช้จริง จึงมีการสังเคราะห์วิตามินอีในรูป tocopheryl acetate ซึ่งมีคุณสมบัติเสถียรกว่า และสามารถถูกเมตาบอไลซ์เป็น α-tocopherol ได้ มีการศึกษาดูความสามารถในการดูดซึม (bioavailability) ของ tocopheryl acetate ในหนูและคน พบว่า tocopheryl acetate มีคุณสมบัติในการดูดซึมและสามารถตรวจพบอยู่ในรูป α-tocopherol ได้ รวมถึงการศึกษาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงก็พบว่า tocopheryl acetate สามารถถูกดูดซึมและเปลี่ยนเป็น α-tocopherol (32-34)



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ α-tocopherol และกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ

(http://www.life-enhancement.com/magazine/article/2274-break-the-bonds-of-dementia)

2071921265

N-acetyl cysteine (NAC)

N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) เป็นกรดอะมิโนที่สำคัญภายในเซลล์ มีคุณสมบัติในการผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยง่าย โดยเมื่อ NAC เข้าสู่เซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็น cysteine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ glutathione และยังสามารถเพิ่ม activity ของเอนไซม์ glutathione-S-transferase ยิ่งไปกว่านั้น extracellular NAC ยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็น nuclrophile ดังนั้นจึงนับได้ว่า NAC เป็นสานต้านอนุมูลอิสระหรือสารออกซิแด้นท์ที่สำคัญอย่างหนึ่ง ในปัจจุบันมีการใช้ NAC เพื่อการรักษาผู้ป่วยหลายโรค รวมถึงยังใช้เป็นยากำจัดพิษของยา acetaminophen (35-37)

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Bladder cancer)

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) เป็นโรคในระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้ทั่วโลก โดยพบบ่อยเป็นอันดับหนึ่งในกลุ่มมะเร็งทางเดินปัสสาวะ จากสถิติมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 3-4 เท่า และความเสี่ยงการเกิดมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่อายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป (38-41) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถแบ่งตามลักษณะของเซลล์ออกเป็น 4 ชนิดดังนี้ 1) Transitional cell carcinoma (TCC) หรือ urothelial carcinoma (UC) ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดถึงร้อยละ 90-95 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 2) Squamous cell carcinoma (SCC) 3) Adenocarcinoma และ 4) Sarcoma นอกจากนั้นยังสามารถแบ่งตามระดับความรุนแรงได้ออกเป็นสองชนิด คือ มะเร็งที่เกิดเฉพาะที่เซลล์

เยื่อบุผิว เรียกว่าเป็นมะเร็งระดับตื้น (superficial type หรือ non-invasive type) ถ้าทะลุเยื่อบุลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อเรียกว่า muscle-invasive type (41, 42) ในการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่จะใช้วิธีขูดเนื้อมะเร็ง (transurethral resection of bladder tumor : TURBT) ร่วมกับ intravesical immunotherapy ด้วยการฉีด Bacillus Calmette-Guerin (BCG) หรือการใช้ Interferon เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (intravesicular infusion) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มาทำลายเซลล์มะเร็ง และ intravesical chemotherapy เช่น cisplatin และ gemcitabine เพื่อเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งและป้องกันการกลับเป็นซ้ำของโรค แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงพบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากผ่าตัดได้สูงถึงร้อยละ 80 ภายในเวลา 5 ปี (43) และพบว่ามีผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยที่ไม่ตอบสนองต่อยาดังกล่าว ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะพบปัสสาวะเป็นเลือดโดยไม่มีอาการเจ็บปวด ทำให้การวินิจฉัยโรคนี้ค่อนข้างล่าช้า และมีการลุกลามเข้าสู่ชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะหรืออวัยวะข้างเคียงได้ ระยะของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้ดังนี้ Stage 0 (T_a (non-invasive papillary),T_{is} (flat non-invasive tumor) มะเร็งยังไม่มีการบุกรุกเนื้อเยื่อข้างเคียง Stage 1 มะเร็งมีการบุกรุกเข้าสู่ชั้น connective tissue แต่ยังไม่ถึงชั้นกล้ามเนื้อ Stage 2 มะเร็งมีการบุกรุกเข้าสู่ชั้นกล้ามเนื้อ Stage 3 มะเร็งมีการบุกรุกไปยังอวัยวะข้างเคียง และ Stage 4 มะเร็งมีการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองและส่วนต่างๆของร่างกาย (44-46)

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การสูบบุหรี่ และความเสี่ยงจะสูงขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น พบว่าคนที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมากกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ 2-4 เท่า ซึ่งอัตราเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนบุหรี่และระยะเวลาที่สูบบุหรี่ด้วย เนื่องจากในควันบุหรี่มีสารก่อมะเร็งอะโรมาติคเอมีน (aromatic amine) ปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น การได้รับสารหนู (arsenic) ที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มหรืออาหารทะเลบางชนิด การทำงานในโรงงานผลิตสีหรือยาง และสารก่อมะเร็งอื่นๆ หลายชนิด (42) ที่ส่งเสริมให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) ทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive species) เพิ่มขึ้น และสร้างสารก่อมะเร็ง (ultimate carcinogens) ไปจับและทำลายดีเอ็นเอ (DNA adduct) ทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ และเกิดการกลายพันธุ์ของยีน นอกจากนั้นยังส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเหนือพันธุกรรม (11) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการเกิดเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในคนปกติที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของมธุรดาและคณะในปี 2012 (14) พบว่าการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ LINE-1 methylation ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติ แสดงให้เห็นว่า LINE-1 hypomethylation ไม่น่าจะสัมพันธ์กับมะเร็งโดยตรงแต่สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และจากการศึกษาวิกรมและคณะในปี 2013 (15) พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (UM-UC-3 cell) สามารถกระตุ้นการให้เกิด LINE-1 hypomethylation ได้ด้วย ROS (H_2O_2) และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (tocopheryl acetate) สามารถป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกที่แน่ชัดที่อธิบายสาเหตุการเกิด LINE-1 hypomethylation ใน

2071921265

ภาวะที่มี oxidative stress หนึ่งในกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับผลของอนุมูลอิสระต่อการเกิด DNA methylation คือ เมื่อเซลล์เกิดภาวะ oxidative stress จะทำให้เซลล์จำเป็นต้องสร้าง glutathione เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดย glutathione ถูกสร้างมาจาก homocysteine ผ่านทาง transsulfuration pathway และเมื่อเซลล์ต้องการสร้าง glutathione มากขึ้น จะทำให้ปริมาณของ homocysteine ลดลง จึงถูกเปลี่ยนไปเป็น methionine เพื่อนำไปสังเคราะห์ SAM ได้น้อยลง ส่งผลให้ปริมาณของ SAM ในเซลล์ลดลง เมื่อปริมาณ SAM ลดลง จึงทำให้เกิด DNA methylation ลดลงด้วย นำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation จากรายงานของ Niedzwiecki และคณะ ในปี 2013 (10) พบว่า ในผู้ใหญ่ที่มีระดับ glutathione ในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับการลดลงของ SAM และการเกิด global hypomethylation ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่ากลไกที่ ROS กระตุ้นให้เกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ น่าจะมาจากการรบกวน one-carbon metabolism pathway และ transsulfuration pathway ทำให้การสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ลดลง และไม่เพียงพอต่อการเกิด DNA methylation

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 2 ชนิด ได้แก่ UM-UC-3 และ TCCSUP cell lines และเซลล์เยื่อบุท่อไตปกติ (HK-2 cell line) กระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นด้วย H_2O_2 และตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation, SAM, SAH และ glutathione นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการ supplement ด้วย tocopheryl acetate, N-acetylcysteine (NAC), SAM, methionine และ folate ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย H_2O_2 การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะและเซลล์บุผิวท่อไต และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การเข้าใจสาเหตุและกลไกในการเปลี่ยนแปลงการเกิด DNA methylation ในเซลล์มากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งในอนาคตได้

2071921265