สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

20711921265

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ในเซลล์บุผิวท่อไต (HK-2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (UM-UC-3 และ TCCSUP) และศึกษาผลของ TA, NAC, methionine, SAM และ folic acid ในการยับยั้งการลดลงของระดับ LINE-1 methylation

ผลการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่าที่ความเข้มข้น 20 μM H_2O_2 หรือน้อยกว่า ไม่ส่งผลทำให้การตายของเซลล์ และจากผลการศึกษาความเป็นพิษของวิตามินอี พบว่าวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 50-300 μM ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์ และจากผลการทดสอบความเป็นพิษของ NAC, Methionine, SAM และ folic acid ตั้งแต่ความเข้มข้น 10-250 μM พบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์

การศึกษานี้เลือกใช้ 20 μM H_2O_2 ในการกระตุ้นเซลล์ให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ โดย พบว่าเซลล์ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP มีการสร้าง ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และพบการเพิ่มสูงขึ้นของระดับโปรตีนคาร์บอนิล ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และจากการศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ TA และ NAC ต่อการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น พบว่า ทั้ง TA และ NAC สามารถลดระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เป็นระยะเวลานาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์ UM-UC-3 และ TCCSUP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นที่เวลาเดียวกัน และพบแนวโน้มการลดลงของ LINE-1 methylation เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับ H_2O_2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การลดลงของ LINE-1 methylation เมื่อกระตุ้นด้วย H_2O_2 (H_2O_2-induced LINE-1 hypomethylation) เป็นแบบ time-dependent manner

ผลการศึกษาผลของ TA, NAC, methionine, SAM และ folic acid ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 เกิดการลดลงของ LINE-1 methylation ทั้งในเซลล์ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์

กลุ่มควบคุม และพบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 ร่วมกับ TA, NAC, methionine, SAM และ folic acid สามารถยับยั้งการลดลงของ LINE-1 methylation ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ glutathione ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าระดับ total glutathione เพิ่มสูงอย่างมีนัยสำคัญในทั้ง 3 เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ขณะที่ reduced glutathione พบสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในเซลล์ HK-2 และ UM-UC-3 และเมื่อให้สารต้านอนุมูลอิสระ TA และ NAC แก่เซลล์ พบว่า ในเซลล์ HK-2 และ TCCSUP สามารถลดการสร้าง total glutathione ได้อย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ขณะที่ในเซลล์ UM-UC-3 พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง คล้ายกันกับเซลล์ HK-2 และ TCCSUP แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM และ SAH ในทั้ง 3 เซลล์ที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าระดับ SAM ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ในขณะที่เมื่อเซลล์ได้รับ NAC, methionine, SAM หรือ folic acid ร่วมด้วย พบว่าระดับ SAM เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ยกเว้นในเซลล์ UM-UC-3 cell ที่ได้รับ H_2O_2 ร่วมกับ folic acid ที่ไม่สามารถเพิ่มระดับ SAM ภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณของ SAH ในเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น และผลของสารต้านอนุมูลอิสระและการชดเชยสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับของ SAH ในเซลล์ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของ SAH พบว่าคล้ายคลึงกับ SAM

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ Hcy ในเซลล์ HK-2 และ TCCSUP ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าระดับ Hcy ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 2 เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และเมื่อให้สารต้านอนุมูลอิสระ NAC แก่เซลล์ร่วมกับ H_2O_2 พบว่า สามารถเพิ่มระดับ Hcy ได้อย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 เพียงอย่างเดียว

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HK-2, UM-UC-3 และ TCCSUP พบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 μM เป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมผัสกับ H_2O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 μM เป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมผัสกับ H_2O_2 เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นชัดว่า oxidative stress เป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดความเครียดและตายได้จากการเกิดออกซิเดชั่นของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ส่งผลให้รบกวนกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ รวมถึง

2071921265

กระบวนการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการเกิด apoptosis (55-59) และผลดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับ H_2O_2 ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้ซึ่งใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นถึง 72 ชั่วโมง จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 20 μM เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ แต่สามารถกระตุ้นภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นได้ดี ซึ่งจากการวัดตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μM H_2O_2 ทำให้มีการสร้าง ROS ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น และระดับโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มสูงขึ้น ยืนยันว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 20 μM สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นได้จริง ดังนั้นสำหรับการทดสอบการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงระดับสารตัวกลางที่เกี่ยวข้องใน one-carbon metabolism และ การวัดระดับ glutathione จึงใช้การกระตุ้นด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 20 μM ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าว ถือว่าเป็น physiological concentration ของ H_2O_2 ที่พบในปัสสาวะ อยู่ในช่วง 1-25 μM (60) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง จึงจำเป็นต้องจำลองภาวะต่างให้ได้ใกล้เคียงกับภาวะในร่างกายให้ได้มากที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสองชนิดคือ TA และ NAC ที่ความเข้มข้น 300 μM (15) และ 50 μM ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ควบคู่กับการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการลดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นที่ความเข้มข้นดังกล่าว จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบอื่นๆ ต่อไป

จากการศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลง LINE-1 methylation พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ให้อยู่ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation ในทุกเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา โดยพบว่าการเกิด LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับ H_2O_2 ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ซึ่งจากผลการศึกษาระดับ LINE-1 methylation พบว่าเซลล์แต่ละชนิดมีระดับ LINE-1 methylation ในกลุ่มควบคุมแตกต่างกัน จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Kreimer และคณะในปี 2013 ที่ศึกษาระดับ methylation ของ retroelement ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และเปรียบเทียบระดับ methylation ของ retroelement ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (61) พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่มีที่มาแตกต่างกัน มีระดับ LINE-1 methylation แตกต่างกัน โดยเซลล์กระเพาะปัสสาวะปกติมีระดับ LINE-1 methylation สูงกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด papilloma origin และ muscle-invasive origin ตามลำดับ ซึ่งจากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของระดับ LINE-1 methylation และความรุนแรงของโรค

จากรายงานของวิกรมและคณะในปี 2013 (15) ที่ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 hypomethylation ภายใต้ oxidative stress ใน UM-UC-3 และทราบผลของ TA ต่อการยับยั้งการเกิด LINE-1 hypomethylation แต่อย่างไรก็ตาม จากรายงานของวิกรม เรายังไม่ทราบกลไกที่

2071921265

แน่ชัดในการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ศึกษากลไกที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด LINE-1 hypomethylation โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย H_2O_2 นาน 72 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เกิด LINE-1 hypomethylation นั่นแสดงให้เห็นว่า oxidative stress เป็นสาเหตุโดยตรงกับการเกิด LINE-1 hypomethylation สอดคล้องกับรายงานของมธุรดาและคณะในปี 2012 ที่พบว่า LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ทั้งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติ (14) และในการศึกษานี้ได้หลักฐานเพิ่มเติมว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิด LINE-1 hypomethylation อย่างไรก็ตามกลไกของ ROS-induced LINE-1 hypomethylation ยังไม่ทราบ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารตัวกลางใน one-carbon metabolism ซึ่งได้แก่ SAM ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เมทิลแก่ DNA ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบการลดลงของ SAM อย่างมีนัยสำคัญ และยังพบการลดลงของ Hcy ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบการเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione ทั้ง total glutathione และ reduced glutathione ซึ่งจากผลดังกล่าว แสดงให้เห็น ถึงกลไกของเซลล์ในการป้องกันอันตรายจากภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น โดยอาศัย glutathione ซึ่งทำหน้าที่หลักในการกำจัดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โดยเมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียดจากอกอซิเดชั่น จะส่งผลให้เกิดการ up-regulation ของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase ในการเปลี่ยน Hcy เป็น cystathionie และ cysteine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ glutathione (62) และจากผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้ สามารถยืนยันปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ และน่าจะอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นได้ โดยเมื่อเซลล์มีการสังเคราะห์ glutathione เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการดึง Hcy มาใช้ในการสังเคราะห์ glutathione ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวไม่สามารถผันกลับได้ ดังนั้นในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เราจะตรวจพบการลดลงของ Hcy และเมื่อ Hcy ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ glutathione เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เหลือ Hcy ที่จะนำมาสังเคราะห์เป็น methionine สำหรับเป็นสารตั้งต้น SAM น้อยลง ดังนั้น จึงพบระดับของ SAM ลดลงในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ซึ่งการลดลงของ SAM ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นนี่เอง ที่น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Niedzwiecki และคณะในปี 2013 ที่รายงานว่าในผู้ใหญ่ที่มีระดับ glutathione ในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับการเกิด global hypomethylation (10) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ reduced glutathione ใน TCCSUP cell พบว่าให้ผลขัดแย้งกับ HK-2 และ UM-UC-3 โดยใน TCCSUP cell ไม่พบการการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับ reduced glutathione ภายหลังการกระตุ้นด้วย H_2O_2 ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการที่ TCCSUP cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง ไม่สามารถ recycle GSSG ให้กลับมาเป็น GSH ได้ ส่งผลให้ปริมาณ reduced glutathione ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ในขณะที่มีปริมาณ total glutathione เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ซึ่งหากต้องการพิสูจน์สมมติฐานนี้ ควรมีการตรวจ antioxidant enzyme เพิ่มเติม ซึ่งนอกจาก glutathione

2071921285

oxidase และ glutathione reductase แล้ว ยังมีเอนไซม์ที่มีส่วนในการกำจัดสารอนุมูลอิสระอื่นๆ อีก อาทิ catalase, superoxide dismutase เป็นต้น (63)

หลังจากพบการระดับของ SAM ที่ลดลงในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของ NAC ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ SAM และการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อชดเชย NAC ให้กับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น พบว่า NAC ที่ชดเชยให้เซลล์ สามารถเพิ่มระดับ SAM ภายในเซลล์ได้ รวมถึงยับยั้งการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ นั่นแสดงให้เห็นว่า NAC ที่ให้กับเซลล์ ถูกนำไปเปลี่ยนเป็น cysteine เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ glutathione ทำให้สามารถลดหรือยับยั้งการดึง Hcy จาก one-carbon metabolism มาใช้ ทำให้มี Hcy เพียงพอสำหรับการสร้าง SAM จึงส่งผลให้ไม่เกิดการลดลงของ SAM รวมถึงไม่เกิด LINE-1 hypomethylation นอกจากนั้นยังพบว่า TA สามารถยับยั้งการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวิกรม ที่พบว่า TA สามารถยังยั้งการเปลี่ยนแปลง LINE-1 methylation ใน UM-UC-3 ได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันผลดังกล่าว เนื่องจากนอกจาก UM-UC-3 cell แล้ว ยังเห็นผลเช่นเดียวกันใน HK-2 cell และ TCCSUP cell ด้วย แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของ TA โดยพบว่าเมื่อให้ TA กับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าระดับ SAM ในเซลล์มีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ จากผลดังกล่าวอาจเกิดเนื่องจากว่า TA สามารถกำจัด H_2O_2 ได้ดี เซลล์จึงไม่มีการเร่งสร้าง glutathione และไม่มีการดึง Hcy มาใช้ ส่งผลให้ระดับของ SAM ไม่ลดลงในเซลล์ที่ได้รับ TA พร้อมกับถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2

จากการศึกษาผลของการชดเชยด้วย methionine, SAM และ folic acid ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นด้วย H_2O_2 พบว่าป้องกันการลดลงของ SAM ได้ รวมถึงสามารถยับยั้งการเกิด LINE-1 hypomethylation ได้ ทั้งนี้เนื่องจากทั้ง methionine, SAM และ folic acid เป็นสารตัวกลางใน one-carbon metabolism pathway ดังนั้นการให้สารเหล่านี้ จึงสามารถส่งเสริมหรือเพิ่มการสังเคราะห์ SAM ในเซลล์ได้โดยตรง

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า การเกิด LINE-1 hypomethylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นนั้น มีสาเหตุมาจากการลดลงของการสังเคราะห์ SAM ใน one-carbon metabolism pathway ภายในเซลล์ ส่งผลให้ไม่มี SAM เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา methylation ซึ่งการลดลงของการสังเคราะห์ SAM น่าจะเป็นผลมาจากการที่ Hcy ถูกดึงมาใช้ใน transsulfuration pathway เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ glutathione และความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะสามารถนำมาใช้เป็นความรู้พื้นฐานและสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อ เพื่อป้องกันการเกิด LINE-1 hypomethylation อันเป็นสาเหตุของการเกิด genomic instability ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการป้องกันหรือรักษามะเร็งต่อไป

2071921265

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของกลไกที่น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีสมมติฐานอื่นๆที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ได้เช่นเดียวกัน เช่น ความเสียหายของสารชีวโมเลกุลในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เช่น โปรตีนต่างๆ ซึ่งจะส่งผลให้ไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มที่ ซึ่งมีรายงานว่า oxidative stress ส่งผลให้เกิดการ down-regulate ของเอนไซม์ DNMT ซึ่งทำให้เกิด DNA methylation ได้ลดลง (64) นอกจากนั้นแล้ว ความเสียหายของดีเอ็นเอ ยังเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญ โดยพบว่าในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น จะส่งผลให้เกิด DNA oxidation ยกตัวอย่างเช่น guanine จะถูกออกซิไดซ์เป็น 8-hydroxyguanine หรือ 8-oxoguanine ซึ่งเบส guanine ที่อยู่ติดกับ cytosine (CpG dinucleotides) (65) เป็นตำแหน่งเป้าหมายที่เอนไซม์ DNMT ใช้ในการจับและเข้าทำปฏิกิริยา ดังนั้นเมื่อเบส guanine ที่อยู่ข้าง cytosine ถูกออกซิไดซ์ จึงทำให้ DNMT ไม่สามารถจดจำตำแหน่งนั้นได้และไม่สามารถเข้ามาเติมหมู่เมทิลให้แก่ cytosine ได้ และเกิด hypomethylation ขึ้นในที่สุด

อีกกลไกที่สำคัญคือ ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น อัตราส่วนระหว่าง NAD^+ ต่อ NADH จะมีค่าสูงขึ้น ทำให้เอนไซม์ Sirtuin-3 (SIRT3) ถูกกระตุ้น ซึ่ง SIRT3 เป็นเอนไซม์ NAD^+-dependent deacetylase ในไมโทคอนเดรีย จะดัดหมู่อะเซติลของ isocitrate dehydrogenase (IDH2) แล้ว IDH2 ถูกกระตุ้นให้เป็น activated IDH2 ซึ่งจะไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน isocitrate เป็น α-ketoglutarate เพิ่มขึ้น และ α-ketoglutarate ที่เพิ่มขึ้น จะทำหน้าที่เป็น co-factor มีผลไปกระตุ้นการทำงานเอนไซม์ ten eleven translocation (TET) โดย TET จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน 5-methylcytosine (^{5m}C) เป็น 5-hydroxymethylcytosine (^{5hm}C) ซึ่งโดยทั่วไป ^{5hm}C จะถูก deamination ได้ง่าย และเมื่อถูก deamination แล้วเซลล์จะตรวจสอบได้ว่า cytosine นี้มีความผิดปกติ ต้องเข้าสู่กระบวนการซ่อมแซม โดย ^{5hm}C จะถูกเอนไซม์ glycosylase เข้ามาตัดออก แล้วเติม cytosine ตัวใหม่ผ่านกลไก nucleotide excision repair (NER) ซึ่ง cytosine ตัวใหม่ที่เติมเข้ามานี้จะเป็น unmethylated cytosine ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิด hypomethylation ขึ้น (66)

นอกจากกลไกที่อาจเป็นไปได้ดังที่กล่าวมาแล้ว ยังคงมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เช่น การแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวของ ทั้งในระดับ mRNA รวมถึงในแง่ของการทำหน้าที่ (function) ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมา จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ที่แน่ชัดต่อไป

และเพื่อเป็นการยืนยันว่าปรากฏการณ์ที่พบในครั้งนี้ เป็นความจริงและเกิดขึ้นจริงในทุกเซลล์ ควรมีการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงสายพันธุ์อื่นๆ ทั้งที่เป็นเซลล์ปกติหรือเซลล์มะเร็ง และควรทำการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันปรากฏการณ์ที่พบในเซลล์ดังกล่าวด้วย

2071921265