

การศึกษาโกลบอลเมทิลเซชันในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน



นางสาวธมลวรรณ วรฤทัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Global methylation in patients with musculoskeletal tumor

Miss Thamonwan Woraruthai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโกลบอลเมทีเลชันในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน
โดย	นางสาวธมลวรรณ วรฤทัย
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	นายแพทย์ กฤษณ์ เจริญลาภ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญา ทองตัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(นายแพทย์ กฤษณ์ เจริญลาภ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันชัย พยุงภร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. กอมธัม สติรกุล)

ชมลวรรณ วรฤทัย : การศึกษาโกลบอลเมทิลเลชันในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน (Global methylation in patients with musculoskeletal tumor) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: นพ. กฤษณ์ เจริญลาภ, 114 หน้า.

โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเป็นโรคที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ กระดูกและระบบประสาท ซึ่งโรคดังกล่าวมีอุบัติการณ์เกิดต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับโรคเนื้องอกชนิดอื่นแต่พบว่ามี ความรุนแรง รวมถึงมีความหลากหลายของโรคค่อนข้างสูง ส่งผลให้ยากต่อการวินิจฉัยและรักษา อย่างไรก็ตามการเจริญของเนื้องอกมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Alu และ LINE-1 methylation นอกจากนี้ภาวะความเครียดออกซิเดชันเป็นอีกกลไกหนึ่งซึ่งส่งผลต่อกระบวนการเกิดเมทิลเลชันที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมและนำไปสู่การเจริญของมะเร็ง ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการเปรียบเทียบระดับและรูปแบบการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ระหว่างชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติข้างเคียง และ peripheral blood leukocytes (PBL) ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน จำนวน 46 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 107 รายด้วยเทคนิค COBRA Alu และ LINE-1 รวมถึงตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อและพลาสมาของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีด้วยเทคนิค ELISA ผลการศึกษาพบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในเนื้องอกของผู้ป่วยliposarcoma สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.042$) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และระดับการเกิด Alu methylation ใน bone tumor ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.044$) ในส่วนของการศึกษา PBL พบว่าระดับการเกิด Alu methylation สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) นอกจากนี้ระดับการเกิด Alu methylation ทั้ง benign และ malignant สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) และผลการวิเคราะห์ระดับการเกิด LINE-1 methylation พบว่าเนื้องอกระดับการเกิด LINE-1 methylation ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.032$) นอกจากนี้ระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ระหว่างเนื้องอกและ PBL มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.779, P<0.001$ และ $r=0.768, P<0.001$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ระดับ 8-OHdG ทั้งในเนื้องอกและพลาสมาจากผู้ป่วยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด methylation ที่เปลี่ยนแปลงไปรวมถึงระดับ 8-OHdG อาจมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5874036030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: ALU / LINE-1 / DNA METHYLATION / EPIGENETICS / MUSCULOSKELETAL TUMORS / BONE AND SOFT TISSUE SARCOMAS

THAMONWAN WORARUTHAI: Global methylation in patients with musculoskeletal tumor. ADVISOR: PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., CO-ADVISOR: CHRIS CHAROENLAP, M.D., 114 pp.

Musculoskeletal tumor is tumor that develops in muscle, bone and nervous system. Although it has low incident disease but it has severity and many subgroups of tumor. Moreover, it is difficult to diagnose and treatment. However, the progression of this tumor related to Alu and LINE-1 methylation. Not only methylation process cause genomic instability but oxidative stress can alternate methylation in tumor. Thus, this study was to determine Alu and LINE-1 methylation level and pattern in neoplastic compared with non-neoplastic adjacent tissues and peripheral blood leukocytes (PBL) of 46 patients with musculoskeletal tumor compared with 107 healthy controls using Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) Alu and LINE-1 involve to 8-OHdG levels in tissue and plasma using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results revealed that Alu methylation level in neoplastic of liposarcoma patients were significantly higher than in non-neoplastic adjacent tissues ($P=0.042$). Moreover, Alu methylation level in bone tumor were significantly decrease ($P=0.044$). In addition, Alu methylation level in PBL was significantly higher than in those healthy controls. Alu methylation level in benign and malignant tumor was significantly higher than in healthy controls ($P<0.001$). LINE-1 methylation in neoplastic tissues was significantly lower than in non-neoplastic adjacent tissues ($P=0.032$). Positive correlation of Alu and LINE-1 methylation between neoplastic tissues and PBL ($r=0.779$, $P<0.001$ and $r=0.768$, $P<0.001$ respectively). Furthermore, neoplastic tissue and plasma from patients were higher 8-OHdG level ($P<0.001$). These findings suggest that alternation of methylation process and 8-OHdG level were associated with musculoskeletal tumor progression.

Department: Biochemistry Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry Advisor's Signature

Academic Year: 2016 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากหลายฝ่ายอย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ให้คำปรึกษาในการทำวิจัย อบรมสั่งสอน แนะนำในหลายด้าน พร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้น อีกทั้งเป็นแบบอย่างที่ดีในการศึกษาและทำงานให้กับผู้เขียน ตลอดจนช่วยผลักดันให้ผู้เขียนตั้งใจและเอาใจใส่การทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณนายแพทย์กฤษณ์ เจริญลาภ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงให้คำปรึกษาและชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร และรองศาสตราจารย์ ดร.กอบธัม สติรกุล ที่ยินดีเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยชี้แนะให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์และเหมาะสมมากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันมีค่าให้กับผู้เขียนตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chula MRC) ที่เอื้อเพื่อเครื่องมือการทำวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้คำปรึกษาและคอยให้กำลังใจ ตลอดจนขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องทุกคนทั้งในระดับปริญญาตรีและปริญญาโทสำหรับกำลังใจที่ดี

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณนายณัฐเทพ วรฤทัย และนางฐิติยา เอื้ออนันต์ ตระกูล บิดาและมารดาที่เป็นแรงผลักดัน ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจสำคัญพร้อมทั้งเชื่อมั่นมาตลอดว่าผู้เขียนสามารถทำได้ดังที่มุ่งหวังไว้ ตลอดจนน้องสาวที่ให้กำลังใจเสมอมาและขอขอบพระคุณญาติทุกท่านที่ช่วยเหลือผู้เขียนตลอดมาและขอบคุณนายโสภณัฐ วรธรรณโก สำหรับความเชื่อมั่นและกำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	16
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	16
คำถามการวิจัย	20
วัตถุประสงค์ของโครงการ	21
สมมติฐานการวิจัย	21
ขอบเขตของการวิจัย.....	22
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	22
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	22
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	23
วิธีดำเนินการวิจัย	24
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	25
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
โรคนีื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน (Musculoskeletal tumor).....	26
DNA methylation.....	28
Long Interspersed nuclear element-1 (LINE-1).....	31
Short Interspersed nuclear element (SINE หรือ Alu).....	34
ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress).....	36
ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชันและการเกิด DNA methylation.....	40

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
ประชากร.....	41
1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population).....	41
2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size).....	41
3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	43
4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (Equipments).....	44
5. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagents).....	44
5.1 สารเคมีทั่วไป (General reagent)	44
5.2 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากชิ้นเนื้อเยื่อ (DNA extraction from tissues) (Vivantis, Malaysia).....	44
5.3 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (DNA extraction from peripheral blood leukocytes) (Vivantis, Malaysia)	45
5.4 สารเคมีสำหรับทำ bisulfite treatment (Zymo research, USA).....	45
5.5 สารเคมีสำหรับทำ quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA).....	45
5.6 สารเคมีสำหรับการเตรียม Polyacrylamide gel.....	46
5.7 สารเคมีสำหรับการทำ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Trevigen, USA)	46
6. การเก็บรวบรวมข้อมูล	47
7. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	47
7.1 การเก็บชิ้นเนื้อเยื่อ.....	47
7.2 การศึกษา DNA methylation.....	47
7.2.1 การสกัดแยก DNA จากชิ้นเนื้อเยื่อและเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง	47

7.2.2 การสกัดแยก DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes).....	48
7.2.3 การวัดปริมาณ DNA	49
7.2.4 นำ DNA มาทำ bisulfite treatment	49
7.2.5 quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA) ของ LINE-1 และ Alu.....	49
7.2.6 การวิเคราะห์รูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน	52
7.3 การวิเคราะห์ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ด้วยเทคนิค ELISA....	55
7.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอในชิ้นเนื้อ.....	55
7.3.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับ 8-OHdG	55
8. การวิเคราะห์ข้อมูล	56
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	58
ผลการวิเคราะห์.....	58
1. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคน้ำอกรกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนกับลักษณะข้อมูลทางคลินิก	58
2. การศึกษาระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคมusculoskeletal tumor ด้วยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA).....	60
2.1 การศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues	60
2.2 การศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes (PBL) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี	65
2.3 การศึกษาระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues.....	71

2.4 การศึกษาระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes (PBL) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี	75
3. การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ด้วยเทคนิค ELISA	82
3.1 การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันใน non-neoplastic และ neoplastic tissue ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor	83
3.2 การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันโดยตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี.....	84
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย การอภิปรายข้อมูล	85
สรุปผลการวิจัย.....	85
อภิปรายผลการวิจัย.....	87
รายการอ้างอิง	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	114

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยจำแนกตามชนิดของโรค	42
ตารางที่ 2	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ COBRA LINE-1 และ COBRA Alu.....	50
ตารางที่ 3	สารเคมี และปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1.....	50
ตารางที่ 4	สารเคมี และปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA Alu.....	51
ตารางที่ 5	สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1.....	51
ตารางที่ 6	สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA Alu.....	52
ตารางที่ 7	สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ของ Alu.....	54
ตารางที่ 8	สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ของ LINE-1.....	54
ตารางที่ 9	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 8% non-denaturing polyacrylamide gel.....	54
ตารางที่ 10	การเจือจางสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG.....	55
ตารางที่ 11	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด methylation และ ลักษณะข้อมูลทางคลินิก	58
ตารางที่ 12	ความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างระดับการเกิด methylation และลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรค เนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน	59
ตารางที่ 13	ระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ที่อาจ ทำให้เกิดความเสี่ยงในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor	82

สารบัญรูป

รูปที่ 1	กระบวนการเกิด methylation ที่บริเวณ promoter ส่งผลให้เกิดการแสดงออกหรือไม่เกิดการแสดงออกของยีน	29
รูปที่ 2	ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดกระบวนการ methylation ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของยีนนำไปสู่การเจริญของโรคมะเร็ง.....	30
รูปที่ 3	โครงสร้างของ LINE-1.....	31
รูปที่ 4	การเคลื่อนที่ของ LINE-1 ในการสร้าง LINE-1 ตัวใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนในจีโนม	32
รูปที่ 5	โครงสร้างของ Alu.....	34
รูปที่ 6	กลไกการเกิด reverse transcription ของ Alu element	35
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์.....	38
รูปที่ 8	โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่มาจาก C8-OH adduct ของเบส guanine	39
รูปที่ 9	8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ Alu methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	61
รูปที่ 10	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ที่หิโนวิเคราะห์ neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues	62
รูปที่ 11	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ที่วิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอกเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues	62
รูปที่ 12	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยแบ่งตามประเภทของโรคที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ของผู้ป่วยรายเดียวกัน	63

รูปที่ 13	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอกเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues.....	64
รูปที่ 14	148% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ Alu methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	65
รูปที่ 15	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls)	66
รูปที่ 16	ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยที่ทำการวิเคราะห์จาก peripheral blood leukocytes ซึ่งวิเคราะห์โดยแบ่งตามความรุนแรงของเนื้องอก	67
รูปที่ 17	ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน	68
รูปที่ 18	ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามต้นกำเนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี	69
รูปที่ 19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับการเกิด Alu methylation ระหว่าง neoplastic tissues กับ peripheral blood leukocytes ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor.....	70
รูปที่ 20	กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes	71
รูปที่ 21	218% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ LINE-1 methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	72
รูปที่ 22	ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ที่วิเคราะห์ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues.....	73

- รูปที่ 23** ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ที่วิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอก เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues..... 73
- รูปที่ 24** ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยแบ่งตามประเภทของโรคที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ของผู้ป่วยรายเดียวกัน..... 74
- รูปที่ 25** ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอก เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues 75
- รูปที่ 26** ระดับการเกิด LINE- 1methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) 76
- รูปที่ 27** ระดับการเกิด LINE- 1methylation ในผู้ป่วยที่ทำการวิเคราะห์จาก peripheral blood leukocytes ซึ่งวิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี 77
- รูปที่ 28** ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน 78
- รูปที่ 29** ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามต้นกำเนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี..... 79
- รูปที่ 30** กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับการเกิด LINE-1 methylation ระหว่าง neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor..... 80
- รูปที่ 31** กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes..... 81
- รูปที่ 32** ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ8-OHdG ในชิ้นเนื้อ (A) ระดับการเกิด Alu methylation (B) ระดับการเกิด LINE-1 methylation ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor..... 83

รูปที่ 33ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG ในพลาสมา และระดับ

การเกิด methylation ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

(A) ปริมาณ 8-OHdG ที่มีการเกิดแบบ hypo- หรือ hypermethylation

ของ Alu (B) ระดับ 8-OHdG ที่มีการเกิดแบบ hypo- หรือ

hypermethylation ของ LINE-1

..... 84



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื้องอก (neoplasm) คือ กลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่อในร่างกายที่เจริญมากผิดปกติและไม่มี ความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อปกติอื่น เกิดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด หรือถ้าพบและกำจัดออกไปก็อาจมี การเจริญต่อไปได้อีก เนื้องอกแบ่งเป็นชนิดไม่ร้าย (benign tumor) และชนิดร้ายหรือมะเร็ง (malignant tumor, cancer) ลักษณะสำคัญของมะเร็งที่แตกต่างจากเนื้องอกชนิดไม่ร้ายคือ การรุกร าคืบ (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) โดยที่มะเร็งสามารถแบ่งได้ตามเนื้อเยื่อต้นกำเนิด ว่ามาจากเนื้อเยื่อชั้นผิว (epithelium) เรียกว่า carcinoma และจากเนื้อเยื่อโครง (mesenchyme) เรียกว่า sarcoma อย่างไรก็ตาม ในส่วนของเนื้องอกของระบบโครงร่าง (musculoskeletal tumor) สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น เนื้องอกปฐมภูมิ (primary bone tumor) คือเนื้องอกที่เกิดขึ้นบริเวณ กระดูกเป็นหลัก ส่วนใหญ่มีต้นกำเนิดมาจาก mesenchyme ถัดมาเป็นเนื้องอกทุติยภูมิ (secondary bone tumor) คือมะเร็งที่แพร่กระจายจากอวัยวะอื่นมายังกระดูก และสุดท้ายคือ เนื้องอกเนื้อเยื่อ อ่อน (soft tissue tumor) คือเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจาก mesenchyme แต่เริ่มเกิดขึ้นนอกกระดูก

โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนถือได้ว่าเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์เกิดต่ำมากเมื่อ เปรียบเทียบกับเนื้องอกชนิดอื่น แต่พบว่ามีหลากหลายของโรคค่อนข้างสูง และมีความรุนแรง มาก โดยที่เนื้องอกกระดูกมีอุบัติการณ์เกิดคิดเป็นร้อยละ 0.5 ของเนื้องอกทั้งหมด โดยพบมากในวัย เด็กมากกว่าวัยผู้ใหญ่ ในส่วนของเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดที่สูงกว่าประมาณ 3-4 เท่า และอาการของโรคนี้อาจแสดงออกในช่วงหลังจากอายุ 50 ปี(1) อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานถึงโรคมะเร็งกระดูก มีอุบัติการณ์การเกิดร้อยละ 0.2 ของมะเร็งทั้งหมด ซึ่งมีความรุนแรงเป็นอันดับที่ 4 ทำให้ผู้ป่วยที่อายุต่ำกว่า 20 ปี เสียชีวิตด้วย โรคมะเร็งดังกล่าว(2) จากการสำรวจและงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งกระดูกที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ในระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาในประเทศแถบยุโรป พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 61.8 และ ประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณร้อยละ 79(3) ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับสมาคมมะเร็งแห่งประเทศไทย สหรัฐอเมริกา (American Cancer Society) ในปี พ.ศ. 2558 ที่คาดการณ์ว่า สถิติการเกิดมะเร็ง กระดูก มีจำนวน 2,970 ราย และมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งกระดูกและข้อจำนวน 1,490 ราย (4) ส่วนมากโรคมะเร็งกระดูกพบมากในวัยเด็กและวัยรุ่น จึงมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตใน ระยะยาวของผู้ป่วย(5) ดังนั้นเนื้องอกกระดูกจึงมีความร้ายแรงต่อระบบสาธารณสุข ในส่วนของมะเร็ง เนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดร้อยละ 1 ของเนื้องอกทั้งหมด ซึ่งในปีพ.ศ. 2547 ได้มีการรายงานว่

ประเทศสหรัฐอเมริกาผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ประมาณ 8,680 ราย และ มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวสูงถึง 3,660 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.15(6) ในส่วนของรายงานในประเทศไทยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2555 คาดการณ์ว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งกระดูกจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 41 ราย(7)

อย่างไรก็ตาม โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น อีกทั้งในการวินิจฉัยนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากโรคนี้จะแสดงอาการก็ต่อเมื่อมีความรุนแรงมากขึ้น จึงต้องอาศัยการตรวจชิ้นเนื้อและดูลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีหลัก แต่ในการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดต่างๆ ในด้านของการแยกเนื้องอกที่ไม่อันตรายออกจากเนื้องอกที่เป็นอันตราย โดยโรคเนื้องอกที่ไม่อันตราย อาจจะทำการรักษาโดยการผ่าตัดและเฝ้าระวังการเกิดซ้ำ ส่วนเนื้องอกที่เป็นอันตราย ผู้ป่วยอาจจะทำการรักษาโดยใช้เคมีบำบัด การฉายรังสีรักษา ร่วมกับการผ่าตัด โดยที่ผู้ป่วยจำนวนมากได้รับการวินิจฉัยช้าก่อนที่จะได้รับการรักษา จึงจำเป็นต้องพัฒนาค้นหาวิธีตรวจและตัวบ่งชี้ (biomarkers) โรคมะเร็งในผู้ป่วย ให้มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้

กระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetics) คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม แต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ DNA กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนรูปแบบของยีน (genotype) มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมในระดับเซลล์ โดยที่กระบวนการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic นี้สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือจากปัจจัยอื่นได้ ยกตัวอย่างเช่น อายุ สิ่งแวดล้อม การดำเนินชีวิต และโรคต่างๆ เป็นต้น โดยทำให้มีหรือไม่มีการแสดงออกของยีนได้ และเป็นกระบวนการที่กำหนดว่าจะมีการถอดรหัสและแปลรหัสไปเป็นโปรตีนต่อไปหรือไม่ อย่างไรก็ตามการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic นี้อาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนทำให้เกิดความเสียหายได้โดยทำให้เกิดโรคมะเร็ง ซึ่งจุดเริ่มต้นของกระบวนการเปลี่ยนแปลงมีความเกี่ยวข้องกับ 3 กระบวนการหลัก ประกอบด้วย DNA methylation, histone modification และ non-coding RNA (ncRNA)-associated gene silencing(8) กระบวนการเกิด DNA methylation เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยทำการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (5-mc) ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณ major groove ของ DNA และส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส (transcription) การแสดงออกของยีนลดลงหรือเพิ่มขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับระดับของการเกิด methylation โดยที่ DNA methylation สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทคือ hypermethylation ซึ่งหมายถึง กลไกการเติมหมู่เมทิลที่สูงกว่าระดับปกติ และ hypomethylation หมายถึง กลไกการเติมหมู่เมทิลที่ต่ำกว่าระดับปกติ กลไกทั้ง 2 ประเภทนี้

สามารถพบในโรคมะเร็งของมนุษย์(9) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลง epigenetic มีความเกี่ยวข้องกับ มะเร็งที่มีการแพร่กระจาย ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็ง ลำไส้ใหญ่(10) เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเกิด global DNA hypomethylation ทำให้สูญเสียกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม กระบวนการถอดรหัสในบริเวณที่โดยปกติจะไม่มีการแสดงออกของยีน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการ แสดงออกของยีนนั้นขึ้น ยกตัวอย่างเช่น proto-oncogene ยกตัวอย่างเช่น K-ras, cyclin D1 และ Her-2 และ tumor suppressor gene ยกตัวอย่างเช่น p16, p53 และ APC เป็นต้น(11)

จากการตรวจเพื่อทำการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งมีหลายตัวบ่งชี้ที่สามารถคัดกรองผู้ป่วย ได้แก่ carcinoembryonic antigen (CEA) ที่ใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งมักพบ ค่า CEA สูง แต่ค่า CEA ไม่ได้จำเพาะต่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เพียงโรคเดียว ส่วนมากจึงใช้ในการ ติดตามผลการรักษาและการกลับมาเป็นซ้ำของโรคดังกล่าว ในการตรวจค่า CEA ทำการตรวจใน ห้องปฏิบัติการโดยการเจาะเลือด(12) นอกจากนี้มีตัวบ่งชี้อื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ AFP (มะเร็งตับ) PSA (มะเร็งต่อมลูกหมาก) เป็นต้น(13) การรักษาโรคมะเร็งมีแนวทางการรักษาหลายวิธี ได้แก่การ ผ่าตัด วิธีเคมีบำบัด การฉายรังสี นอกจากโรคมะเร็งอาจมีสาเหตุมาจากพันธุกรรมแล้ว พบว่ามีความ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเหนือพันธุกรรม หลายงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาตัวบ่งชี้ที่อาจใช้ในการ ตรวจวินิจฉัยถึงโรคมะเร็ง โดยมีการศึกษากระบวนการเกิด DNA methylation ทั้งของผู้ป่วย โรคมะเร็งหลายชนิด

Long Interspersed nuclear element-1 (LINE-1) คือ retrotransposon ที่มีลำดับ เบสเรียงตัวซ้ำกันหลายหน่วย กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต โดยที่ LINE-1 มีประมาณ 500,000 ชุด เป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 17 ของจีโนมในมนุษย์ทั้งหมด(14) สามารถ เพิ่มจำนวนตัวเองอย่างอิสระ(15) LINE-1 มีการทำงานในเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงระหว่างการเจริญของตัวอ่อน(16),(17) ในทางกลับกันเซลล์ร่างกาย จะมีการยับยั้ง LINE-1 แบบ epigenetic(18) อย่างไรก็ตาม การทำงานของ LINE-1 จะทำให้ภายในจีโนมของมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบใหม่ ส่งผลให้ เป็นบริเวณที่เกิดกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้มีความแปรผันทางจีโนม และอาจเกี่ยวข้องกับ พยาธิกำเนิดของโรคพันธุกรรมหลายชนิด รวมทั้งโรคมะเร็ง ซึ่งเกิดจากการสะสมของยีนที่เกิดการ กลายพันธุ์(19),(20) การทำงานของ LINE-1 มีความแตกต่างกันตามประเภทของมะเร็ง และมีการ แปรผันในช่วงระหว่างที่มีการพัฒนาของมะเร็ง(21) โดยปกติ LINE-1 มีการศึกษาในเชิง epigenetic ในมะเร็งเพื่อศึกษาถึงผลของระดับการเกิด methylation ในมะเร็ง

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า มีการศึกษาการเกิด hypomethylation ของ LINE-1 ในมะเร็งหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งต่อมน้ำลาย มะเร็งกล่องเสียง มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น ผลการวิจัยเป็นไปในทิศทางเดียวกัน พบว่าในมะเร็งมีระดับการเกิด methylation ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง(22) จากผลการวิจัยดังกล่าวจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่า LINE-1 hypomethylation สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งดังกล่าวได้ นอกจากนี้แสดงให้เห็นว่า LINE-1 hypomethylation มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาและความรุนแรงของมะเร็งได้ ถึงแม้ว่าการศึกษา global hypomethylation ในโรคมะเร็งได้มีการศึกษาอย่างมาก แต่การศึกษาในโรคเนื้องอกกระดูก และเนื้อเยื่ออ่อนมีการศึกษาน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น ซึ่งถ้าสามารถเข้าใจถึงระดับการเกิดรวมถึงรูปแบบของ methylation ในเนื้องอกดังกล่าวได้ อาจจะสามารถนำผลการศึกษาที่ได้มาประยุกต์พัฒนาช่วยในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรครวมถึงติดตามผลการรักษาได้ต่อไป

Alu หรือ short interspersed nuclear element (SINE) คือ retrotransposon ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ LINE-1 ในจีโนมของมนุษย์คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 11(23) ซึ่ง Alu สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม การเพิ่มเติมหรือขาดหายไป และการเกิด recombination ที่ไม่สมบูรณ์(24) ในทางเดียวกันกับ LINE-1 พบว่าในเซลล์ปกติ การทำงานของ Alu นั้นจะถูกยับยั้งโดยการเกิด methylation ผ่านลำดับเบส(25) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า มะเร็งบางชนิดมีการเกิด hypomethylation ของ Alu(26),(27) จากการศึกษาที่ผ่านมาจึงทำให้เกิดแนวคิดที่ว่า การที่ LINE-1 และ Alu เกิดการกระตุ้นซ้ำในเซลล์ปกติผ่านการเกิด hypomethylation สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม ส่งผลให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด(28)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) โดยในร่างกายคนปกติสามารถผลิตสารอนุมูลอิสระ (free radical) ได้สูงถึง 10,000-20,000 ต่อวัน อย่างไรก็ตามบางกรณี ROS มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานทางด้านชีววิทยาของมนุษย์ ในขณะเดียวกัน ROS เปรียบเหมือนตัวแทนของผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการทางด้านเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต [2] ซึ่งในร่างกายมีการผลิต ROS หลายชนิด ได้แก่ superoxide ($O_2^{\cdot-}$) hydroxyl radical (OH^{\cdot}) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen (O_2) [20] ถึงแม้ในร่างกายของมนุษย์มีกระบวนการกำจัด ROS ด้วยสารกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidants) ทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ที่สลาย $O_2^{\cdot-}$ กลายเป็น H_2O_2 และ O_2 โดยที่เอนไซม์ SOD พบในเกือบทุกเซลล์และใน extracellular fluid นอกจากนี้มี

เอนไซม์ catalase สามารถสลาย H_2O_2 ได้เป็น H_2O และ $O_2 \cdot$ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณ H_2O_2 นอกจากนี้มีเอนไซม์ glutathione peroxidase (GSHPx) สามารถสลาย H_2O_2 ได้เป็น H_2O และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอีที่ได้จากผักและผลไม้ อย่างไรก็ตาม ROS ที่ไม่สามารถกำจัดออกได้มีผลต่อการเกิดความผิดปกติของร่างกาย ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง [2] โรคมะเร็งที่เกิดจาก oxidative stress เกิดจาก 2 กลไกหลัก กลไกแรกคือ oxidative damage ควบคุมการเกิดมะเร็งผ่านทาง การแสดงออกของยีน เป็นผลมาจากมีการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายผิดพลาด ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ กลไกที่สองคืออนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เกิดพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามในการตรวจวัดระดับของ oxidative stress ส่วนมากทำการตรวจวัดใน 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) เนื่องจากเป็นสารที่มีรูปแบบโครงสร้างง่ายต่อการศึกษา และเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์อาจเป็นผลมาจากการสร้าง 8-OHdG ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด transversion ของ GC เป็น TA นอกจากนี้ 8-OHdG มีการสูญเสียความจำเพาะในการจับคู่เบส การเพิ่มเบส adenine ตรงข้ามกับบริเวณที่เกิดความเสียหาย ดังนั้นจึงเหมาะกับการเป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็ง [23]

คำถามการวิจัย

คำถามหลัก ระดับและรูปแบบการเกิด global methylation ของ LINE-1 และ Alu ระหว่างชิ้นเนื้ออก (neoplastic tissues), ชิ้นเนื้อปกติข้างเคียง (non-neoplastic adjacent tissues) และใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี รวมถึงการตรวจวัดระดับ 8-OHdG ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และพลาสมาของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีความแตกต่างกันหรือไม่

คำถามรอง การเกิด methylation และรูปแบบของ LINE-1 และ Alu elements ในเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีความสัมพันธ์กับใน peripheral blood leukocytes หรือไม่อย่างไร รวมถึงระดับ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีความสัมพันธ์กับระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation หรือไม่อย่างไรและความสัมพันธ์นี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีในการพยากรณ์โรคได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับและรูปแบบการเกิด methylation ของ LINE-1 และ Alu ใน neoplastic tissues, non-neoplastic adjacent tissues และ peripheral blood leukocytes จากผู้ป่วยโรคน้ำอองกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน โดยอาศัยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA) รวมถึงตรวจวัดระดับการเกิด 8-OHdG ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และพลาสมาของผู้ป่วย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด methylation และรูปแบบของ LINE-1 และ Alu elements ในเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เปรียบเทียบกับ peripheral blood leukocytes รวมถึงระดับ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคน้ำอองกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนมีความสัมพันธ์กับระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ซึ่งทำให้ทราบความสัมพันธ์ดังกล่าวและอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค

สมมติฐานการวิจัย

สมมติฐานหลัก ผู้ป่วยโรคน้ำอองกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนจะมีระดับ methylation ลดลง (global hypomethylation) ใน neoplastic tissues เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และจะมีรูปแบบของการเกิด methylation ที่แตกต่างจาก non-neoplastic adjacent tissues รวมถึงระดับ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคน้ำอองกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนน่าจะมีปริมาณน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม

สมมติฐานรอง การเกิด methylation และรูปแบบของ LINE-1 และ Alu elements ในชิ้นเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนและ peripheral blood leukocytes มีระดับที่ลดลง และมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี เพื่อพยากรณ์โรคน้ำอองกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนได้

ขอบเขตของการวิจัย

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ ซึ่งมีความจำเป็นต้องเข้ารับการรักษา และชิ้นเนื้อที่เลือกเก็บเป็นชิ้นเนื้อที่ต้องผ่าตัดออกจากผู้ป่วยตามแผนการรักษา ซึ่งศัลยแพทย์เป็นผู้คัดเลือกกว่าชิ้นเนื้อดังกล่าวโดยดูลักษณะทางพยาธิกายวิภาค (gross pathology) โดยการศึกษาครั้งนี้จะดำเนินการเก็บชิ้นเนื้อที่เป็นเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และทำการเจาะเลือดจากผู้ป่วย

ในส่วนของกลุ่มควบคุมนั้น มีการเก็บเลือดจากกลุ่มที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติได้รับการรักษาด้วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน รวมถึงโรคเรื้อรัง เช่นโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือและชุดการทดสอบต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้นๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความสมัครใจ ภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

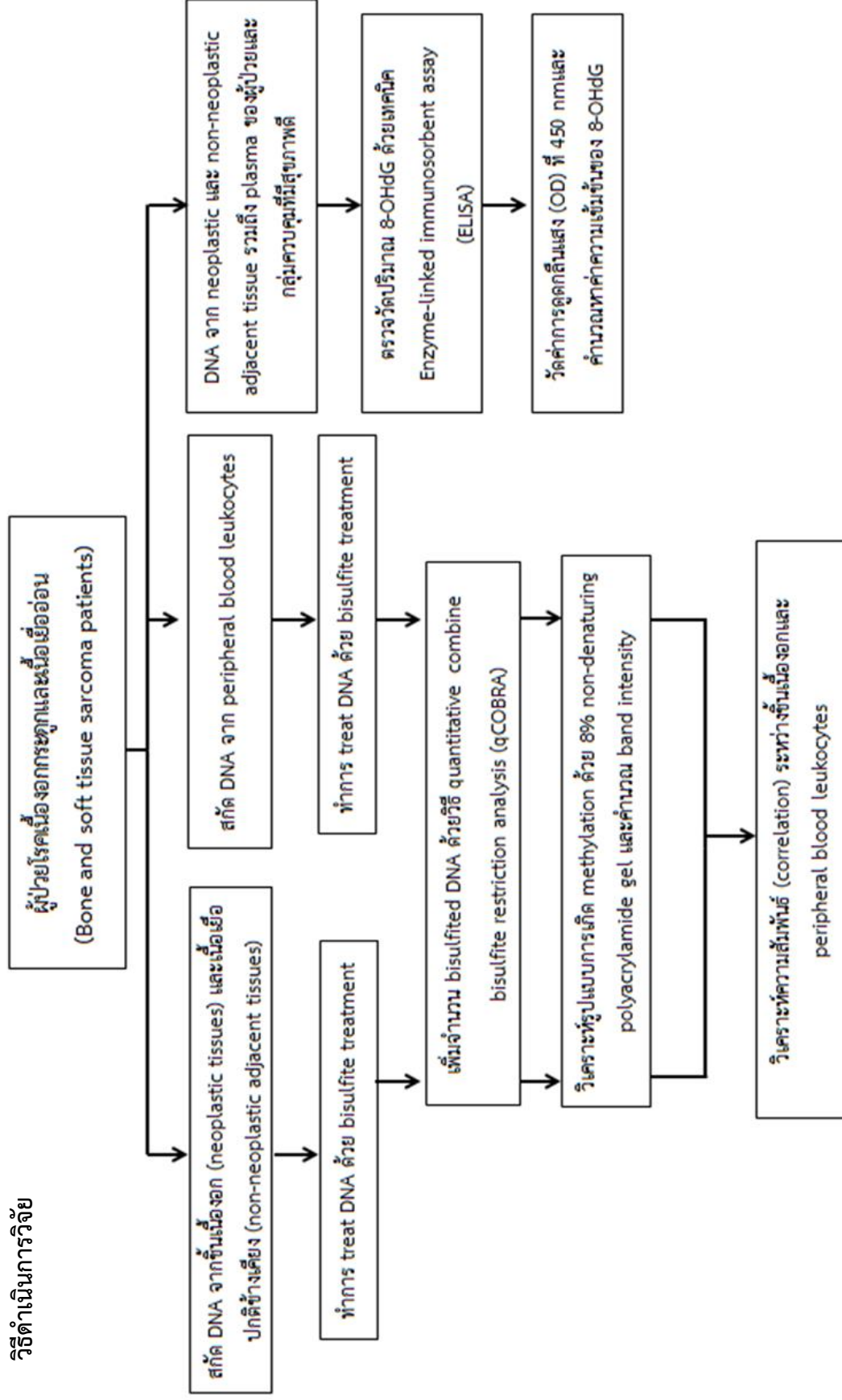
- Musculoskeletal tumor หรือโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเป็นเนื้องอกที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ กระดูก และระบบประสาท สามารถจำแนกได้เป็นเนื้องอกชนิดไม่รุนแรง (benign) และรุนแรง (malignant)
- Bisulfite treatment เป็นการดิงหมู่เอมีน (-NH₂) ที่เบสไซโตซีน (cytosine) ออก ทำให้สามารถเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล (uracil) ได้ จึงนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์กระบวนการเกิด DNA methylation
- quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA) คือ เทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ bisulfited DNA เพื่อตรวจสอบระดับการเกิดและรูปแบบ methylation

- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นวิธีตรวจหาสารที่ต้องการศึกษา โดยอาศัยการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการศึกษา โดยที่แอนติเจนหรือ แอนติบอดีมีการติดฉลากด้วย เอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบผิวเอาไว้ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณกับสารที่ต้องการตรวจหา ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนมากกว่าก็สามารถจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบริเวณเพลทได้มากกว่า และเมื่อเติมสารตั้งต้น (substrate) ก็จะได้สีเข้มแตกต่างกันตามจำนวนของ แอนติเจนและ แอนติบอดีคอนจูเกต
- Polyacrylamide gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก DNA ที่มีขนาดเล็กหรือแยกโปรตีน โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นถึงระดับการเกิดและรูปแบบของ methylation ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงจากผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ซึ่งอาจนำผลการวิจัยทาง epigenetics มาช่วยอธิบายกลไกพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็งกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน อีกทั้งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์และติดตามการรักษาโรคดังกล่าวได้ ทำให้ทราบถึงกระบวนการที่เปลี่ยนแปลงไปของการแสดงออกของ Alu และ LINE-1 นอกจากนี้ความรู้ที่ได้รับจากการวิจัยครั้งนี้อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาเป็นองค์ความรู้ใหม่ได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตรชีวเคมี และ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยแก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
3. เก็บข้อมูลและตัวอย่างชิ้นเนื้อออก ชิ้นเนื้อปกติข้างเคียงและ peripheral blood leukocytes จากผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน
4. สกัด DNA จากชิ้นเนื้อตัวอย่างและ peripheral blood leukocytes
5. ทำ bisulfite treatment และ qCOBRA Alu และ LINE-1
6. ศึกษาและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด methylation ในชิ้นเนื้อตัวอย่างและ peripheral blood leukocytes
7. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล
8. สรุปผลการวิจัย เขียนรายงานวิทยานิพนธ์
9. นำเสนอผลงานการวิจัยต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน (Musculoskeletal tumor)

โรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เป็นเนื้องอกที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ กระดูก และระบบประสาท สามารถแบ่งประเภทได้เป็นเนื้องอกชนิดไม่รุนแรงและรุนแรง อีกทั้งแบ่งย่อยเป็นชั้นปฐมภูมิและชั้นทุติยภูมิได้อีกด้วย เนื้องอกชั้นปฐมภูมิ (primary tumor) มีจุดกำเนิดมาจากกระดูกกล้ามเนื้อ หรือเนื้อเยื่ออ่อน ในขณะที่เนื้องอกชั้นทุติยภูมิ (secondary tumor) หมายถึงเนื้องอกที่มีการกระจายตัวจากบริเวณใดบริเวณหนึ่งในร่างกายไปยังกระดูก กล้ามเนื้อ หรือเนื้อเยื่ออ่อน(29)

โรคเนื้องอกในระบบกล้ามเนื้อ กระดูกและข้อ เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ต่ำมาก อีกทั้งสามารถแบ่งได้หลากหลายประเภท เป็นมะเร็งที่เกิดจากกระดูก กระดูกอ่อน กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่ออ่อน คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 0.5 ของมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งพบอุบัติการณ์เกิดในวัยเด็กมากกว่าวัยผู้ใหญ่(30) สามารถจัดประเภทได้เป็นชนิดที่รุนแรงและไม่รุนแรง โดยที่ชนิดไม่รุนแรงมีอุบัติการณ์การเกิดประมาณ 3,000 คนต่อประชากร 1 ล้านคน ส่วนชนิดที่รุนแรงพบอุบัติการณ์การเกิดประมาณ 30 คนต่อประชากร 1 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 1 ของเนื้องอกทั้งหมด โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเนื้องอก อาการ ตำแหน่ง อายุ และเพศของผู้ป่วย มีทั้งที่เป็นเนื้องอกธรรมดา (benign tumor) และมะเร็ง (malignant tumor) โดยที่ benign tumor มีอุบัติการณ์เกิดมากกว่า 100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ malignant tumor(31) สามารถแบ่งย่อยเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เนื้องอกกระดูก (bone tumor) และเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue tumor) ตำแหน่งส่วนใหญ่ที่พบ คือ แขน ขา มือ และเท้า ประมาณร้อยละ 75 และอีกร้อยละ 10 จะพบที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวและในช่องท้อง โรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนส่วนมากพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และอายุเฉลี่ยที่พบประมาณ 65 ปี พบว่าร้อยละ 10 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งกล้ามเนื้อมีการแพร่กระจาย ซึ่งผู้ป่วยจำนวนร้อยละ 33 มีโอกาสเสียชีวิตจากโรคมะเร็งที่ลุกลามไปยังปอด สามารถเกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด mesenchymal หรือ connective tissue ในร่างกายได้ อย่างไรก็ตามระยะแรกจะไม่แสดงอาการจนกระทั่งเมื่อระยะเวลาผ่านไป จึงปรากฏอาการและแสดงอาการ โรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนชนิดไม่รุนแรง (soft tissue tumor) ที่พบได้บ่อยได้แก่ เนื้องอกไขมัน (lipoma), fibrous tumor และเนื้องอกในหลอดเลือด ในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนส่วนใหญ่พบโรคมะเร็งกล้ามเนื้อลาย (rhabdomyosarcoma) ส่วนกลุ่มผู้ป่วยวัยรุ่นมักพบโรคมะเร็งเยื่อข้อ (synovial sarcoma)(32) และกลุ่มผู้สูงอายุมักพบโรคมะเร็งไขมัน (liposarcoma) และมะเร็งกล้ามเนื้อเรียบ (leiomyosarcoma) สาเหตุของการเกิดโรคนี้อาจยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจาก

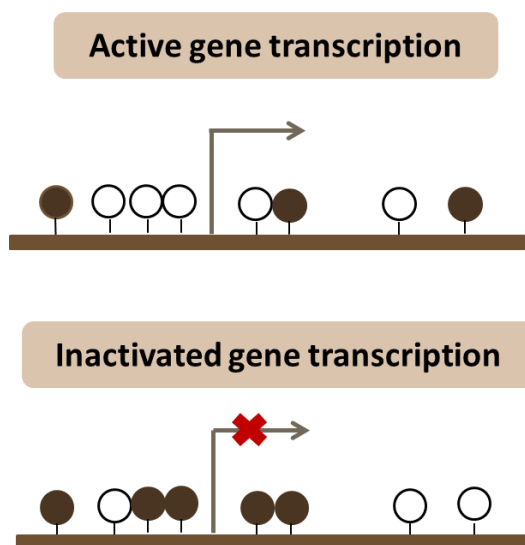
ปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม การได้รับรังสี การติดเชื้อไวรัส หรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้มีรายงานว่าพบเนื้องอกของเนื้อเยื่ออ่อนชนิดมะเร็งเกิดขึ้นบริเวณที่มีแผลเป็น ตรงบริเวณที่มีการหักของกระดูก และใกล้กับบริเวณที่มีการผ่าตัด(1) งานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) สามารถบ่งบอกถึงภาวะการเกิดมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนได้ (33) จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษากระบวนการเกิด global demethylation ของ LINE-1 ในโรค chondrosarcoma หลังจากที่มีการบำบัดด้วย 5-aza-2-deoxycytidine ในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการรุกรานของเนื้องอกและทำให้เนื้องอกเจริญมากขึ้น จึงอาจกล่าวได้ว่า global hypomethylation หลังจากได้รับการบำบัดด้วย 5-aza-2-deoxycytidine อาจช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้องอกในเซลล์ chondrosarcoma ของสัตว์ทดลอง(34)

โรคเนื้องอกกระดูก (bone tumor) มีอุบัติการณ์ของโรคต่ำมากเช่นเดียวกับเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน คิดเป็นประมาณร้อยละ 0.2 ของเนื้องอกทั้งหมด อาการและอาการแสดง เช่น ผู้ป่วยมีอาการปวดอย่างรุนแรง เนื่องจากโครงสร้างของกระดูกนั้นได้รับความเสียหาย ส่งผลให้เกิดการแตกหักของกระดูกได้ง่าย และเกิดอาการปวดอย่างรุนแรง โดยทั่วไปโรค โดยโรคมะเร็งกระดูกในเด็กมีอุบัติการณ์ของโรคค่อนข้างต่ำ จากรายงานพบว่ามีอุบัติการณ์ประมาณ 8.7 ราย ในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 20 ปี จาก 1 ล้านคน(35) ซึ่งโรคเนื้องอกกระดูก (benign bone tumor) พบในช่วงอายุต่ำกว่า 30 ปี เช่น osteochondroma, osteoblastoma, giant cell tumor เป็นต้น ในส่วนของโรคมะเร็งกระดูก (malignant bone tumor) เช่น osteosarcoma, chondrosarcoma เป็นต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามะเร็งกระดูกชนิด osteosarcoma พบมากที่สุดร้อยละ 35 โดยมะเร็งดังกล่าวมีการตรวจพบ malignant mesenchymal cells ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้าง osteoid และกระดูกเจริญไม่เต็มที่ รองลงมาคือ chondrosarcoma ร้อยละ 25 และ Ewing sarcoma ร้อยละ 16 เนื่องจากในระยะแรกโรคนี้อาจจะไม่แสดงอาการ ทำให้การวินิจฉัยโรคดังกล่าวเป็นไปได้ช้า ส่งผลให้รักษาไม่ทันท่วงที อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาหลายงานได้อธิบายไว้ว่า การเกิดเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนอาศัยปัจจัยประกอบด้วย 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม (genetic) และปัจจัยทางด้านเหนือพันธุกรรม (epigenetics) (36), (37), (38) งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับ LINE-1 methylation ในโรคเนื้องอก ameloblastoma และ keratocystic odontogenic (KCOT) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่มีจุดกำเนิดเดียวกัน แต่มีระดับความรุนแรงและการเกิดซ้ำที่ต่างกัน พบว่า LINE-1 methylation ของ KCOT สูงกว่าใน ameloblastoma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการเกิด global hypomethylation ของ ameloblastoma สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ตับ ต่อมลูกหมาก ปอด กระเพาะอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าระดับการเกิด global hypomethylation ในเนื้องอกต่ำกว่าในเนื้อเยื่อปกติ (39) รวมทั้งยังมีการศึกษา LINE-1 และ Alu methylation ของโรค multiple myeloma (MM) พบว่าในผู้ป่วยโรค MM มีระดับ LINE-1 และ Alu methylation

ในเนื้องอกหรือเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ในมะเร็งนั้นลดลง ทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม แต่ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีระดับการเกิด methylation สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นก่อนหน้านี้ พบว่าระดับการเกิด global hypomethylation นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้องอก จึงแสดงให้เห็นว่า DNA hypomethylation ในโรคมะเร็งอาจทำให้เกิดกระบวนการ mitotic recombination ที่ผิดปกติ ส่งผลให้โครโมโซมเกิดความเสียหาย หรือเกิดการย้ายตำแหน่งของโครโมโซม นอกจากนี้มีหลักฐานที่สนับสนุนว่า กระบวนการเกิด global hypomethylation ของ repetitive elements ในเนื้องอก MM นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค และการตรวจ DNA methylation ในขณะที่มีการเจริญของเนื้องอก MM จึงอาจประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งดังกล่าวได้(40) นอกจากนี้มีการศึกษาใน Alu methylation พบว่าในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) นั้นเกิดกระบวนการ Alu hypomethylation ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า การเกิด Alu methylation ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดกระบวนการ transcription เพิ่มขึ้นของ Alu จึงทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเจริญของเนื้องอก(41) จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้โรคมะเร็งดังกล่าวมีอุบัติการณ์เกิดโรคต่ำมาก แต่มีความรุนแรงและอันตรายสูงต่อผู้ป่วย ดังนั้นการศึกษาวิจัยโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีและอณูชีววิทยาอาจทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจ หรือการป้องกันการเกิดโรคซึ่งมีความสำคัญต่อการศึกษาโรคมะเร็งดังกล่าวนี้

DNA methylation

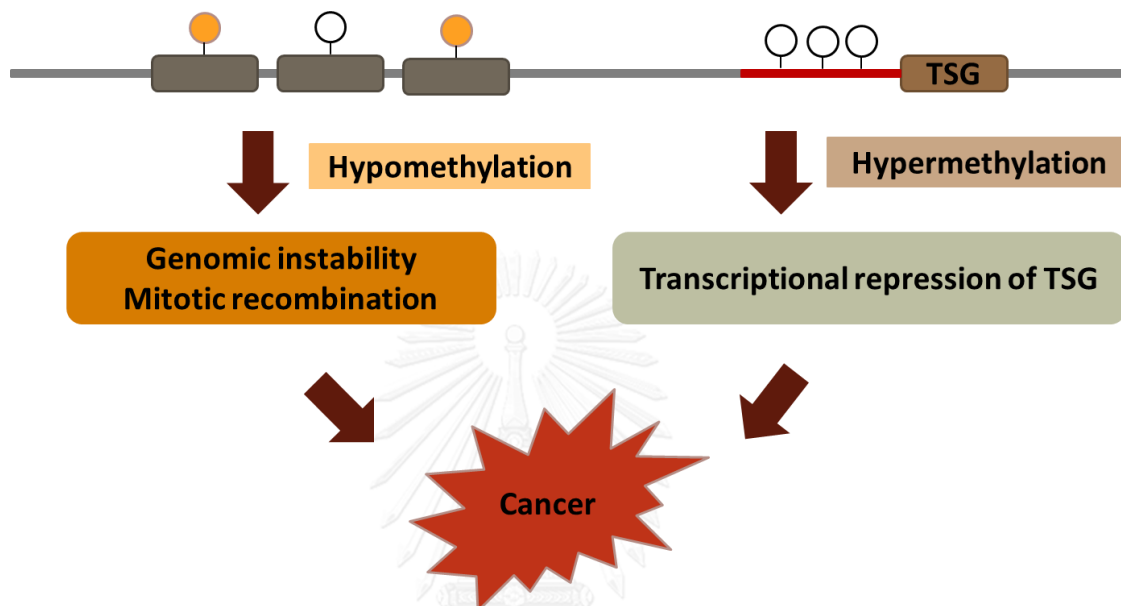
กระบวนการ DNA methylation จัดเป็น epigenetic ชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดขึ้นแล้วส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยทั่วไปยีนที่มีการแสดงออกจะเกิด DNA methylation ชนิด hypomethylation ในทางกลับกันยีนที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจะเกิดกระบวนการ hypermethylation ในบริเวณ promoter



รูปที่ 1 กระบวนการเกิด methylation ที่บริเวณ promoter ส่งผลให้เกิดการแสดงออกหรือไม่เกิดการแสดงออกของยีน (● หมายถึง ตำแหน่งของเบสไซโตซีนที่มีการเกิด methylation และ ○ หมายถึง ตำแหน่งของเบสไซโตซีนที่ไม่มีการเกิด methylation)

เนื่องจากการศึกษาการเกิดกระบวนการ hypermethylation ของ LINE-1 และ Alu ในโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ พบว่ามีการเกิดกระบวนการดังกล่าวในเนื้อเยื่อปกติ และเนื้องอก ซึ่งตรงข้ามไม่พบในกระบวนการเกิด global hypomethylation แสดงให้เห็นว่าการเกิด hypermethylation อาจจะทำให้เกิดเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้ (42) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษากระบวนการ global hypomethylation ของ LINE-1 และ Alu ในโรคมะเร็งหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น โรคมะเร็งต่อมน้ำลาย (mucoepidermoid carcinoma) มีการศึกษาในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงของต่อมน้ำลาย เนื้อเยื่อส่วนระหว่างเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง (intermediate cells) และเซลล์หลังสารเมือก (mucous cells) พบว่ามีความแตกต่างของระดับ methylation ที่ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเซลล์ และมีระดับของ methylation ในเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง intermediate cells และ mucous cells ลดลงตามลำดับ โดยที่ระดับการเกิด methylation ใน intermediate cells นั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า intermediate cells ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงกับ mucous cells นั้น น่าจะแยกออกมาจากเซลล์สำรอง (reserve cells) ในหน่วยของเซลล์ต่อมน้ำลาย และเชื่อว่าเป็น progenitor cells ของ mucous cells ดังนั้นอาจจะเป็นส่วนที่อยู่กึ่งกลางในการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เนื้อเยื่อปกติข้างเคียงและ mucous cells ได้ แต่การศึกษาดังกล่าวไม่สามารถวัดระดับการเกิด methylation จากเซลล์สำรอง ในหน่วยของเซลล์ต่อมน้ำลายได้โดยตรง ทำให้ยังไม่สามารถสรุปผลได้ว่าระดับการเกิด LINE-1 hypomethylation นั้นลดลงจากเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงและ mucous cells นอกจากนี้ระดับ

methylation ที่ลดลงมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของมะเร็ง อีกทั้งเนื้อเยื่อของมะเร็งต่อมน้ำลาย มีระดับของ methylation ที่ต่ำลงในทุกเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติของต่อมน้ำลาย(43) นอกจากนี้มีการศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง พบว่าเนื้อเยื่อ มะเร็งลำไส้ใหญ่มีการเกิดกระบวนการ hypomethylation ของ LINE-1 ที่บริเวณ promoter แต่ไม่ พบว่าเกิดกระบวนการดังกล่าวในเนื้อเยื่อปกติ(44)

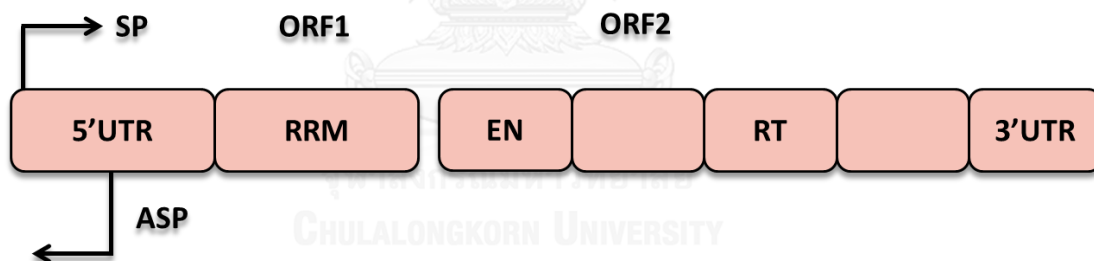


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดกระบวนการ methylation ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิด ความผิดปกติของยีน นำไปสู่การเจริญของโรคมะเร็ง (● หมายถึง ตำแหน่งของเบสไซโตซีนที่มีการ เกิด methylation และ ○ หมายถึง ตำแหน่งของเบสไซโตซีนที่ไม่มีการเกิด methylation)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งนั้นมีความเกี่ยวข้อง กับการเปลี่ยนแปลงไปของ DNA methylation ดังแสดงในรูปที่ กล่าวคือเซลล์มะเร็งมีการเกิด methylation ของ LINE-1 และ Alu ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยทำการศึกษาใน เนื้อเยื่อของโรคมะเร็งหลายชนิด และตรวจวัดจากระดับรวมถึงรูปแบบของการเกิด methylation ใน LINE-1 และ Alu(9) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาใน peripheral blood leukocytes ของ LINE-1 และ Alu พบว่า ผู้ป่วยมีระดับการเกิด methylation ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (8, 45) ดังนั้นการเกิด DNA methylation ที่เปลี่ยนแปลงไปของ LINE-1 และ Alu มีความสัมพันธ์ กับการเกิดเนื้องอกและสามารถพัฒนาให้เกิดมะเร็งได้

Long Interspersed nuclear element-1 (LINE-1)

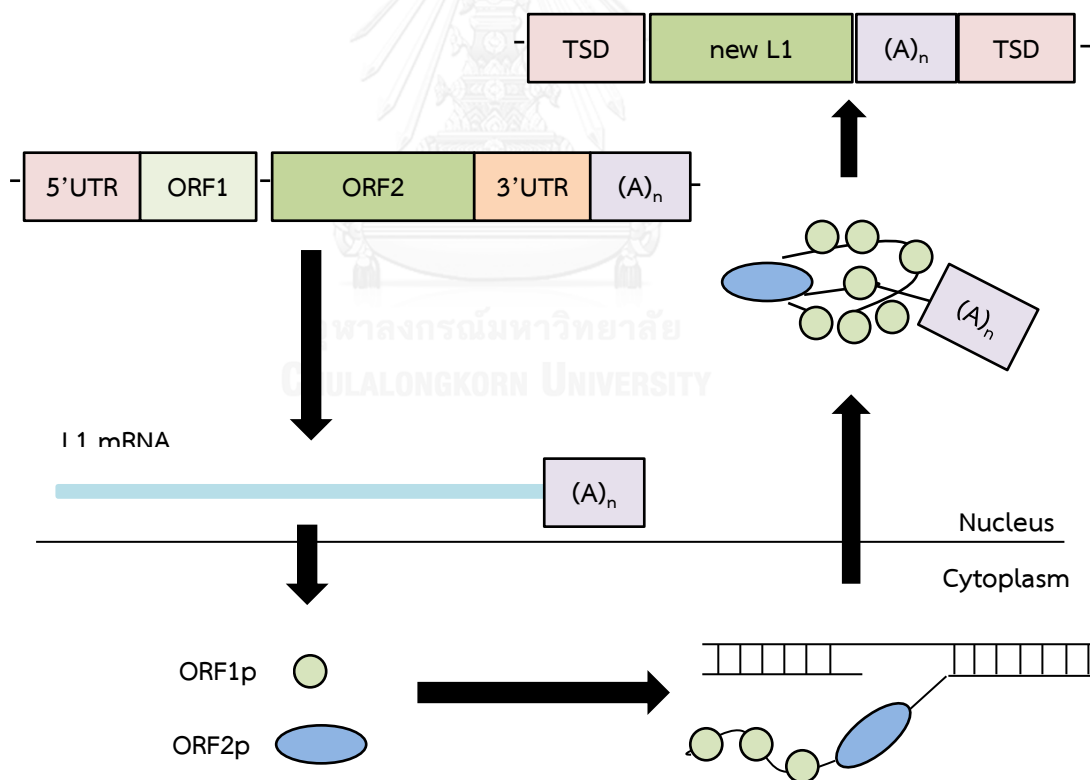
Long interspersed nuclear elements (LINE-1) คือ retrotransposon ชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของ non-long terminal ซ้ำๆ กันหลายหน่วย (non-LTR) ในจีโนมของมนุษย์ ซึ่งพบมากกว่า 500,000 ชุด คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 17 (44, 46) มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างอิสระผ่านตัวกลางที่เป็น RNA นอกจากนี้องค์ประกอบหลักของ LINE-1 พบว่าความสามารถของ retrotransposition มีการเสียหายไป ส่งผลให้ปลาย 5' มีการขาดหายไป เกิดการปรับเปลี่ยนแบบกลับ หรือเกิด point mutation ซึ่งเกิดขึ้นในช่วง reverse transcription หรือเกิดการจำลองโครโมโซมของส่วนที่มีการเพิ่มเติมเข้าไป นอกจากนั้นในจีโนมของมนุษย์มีในส่วนของ LINE-1 ที่ทำงานได้ประมาณ 50-120 ตัว (ร้อยละ 5-10 ของบริเวณที่ทำงานได้) (47) LINE-1 เหล่านี้อาศัยกลไกการทำงานแบบคัดลอก-วาง (copy-and-paste) เพื่อเพิ่มจำนวนของตัวเองตลอดทั้งจีโนม ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อยีนบริเวณข้างเคียง และลำดับเบสของตัวควบคุม ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนภายในจีโนม เกิดเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็งด้วย (48) โครงสร้างของ LINE-1 มีความยาวประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 5'untranslated region (5'UTR) Open reading frame 2 ชนิด คือ ORF1 และ ORF2 และปลาย 3'UTR มีส่วนที่ประกอบด้วย poly(A) tail ดังแสดงในรูปที่ 1(49)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ LINE-1 ที่ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 5'UTR Open reading frame 2 ชนิด คือ ORF1 และ ORF2 และปลาย 3'UTR มีส่วน poly(A) tail(49)

โดยการเคลื่อนที่ของ LINE-1 เพื่อทำการสร้าง LINE-1 ตัวใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีการเกิด 5 ขั้นตอน เริ่มจากกระบวนการถอดรหัส full length-L1 elements (FL-L1) จาก promoter ภายในจีโนมโดย RNA polymerase II อย่างไรก็ตามการเกิดกระบวนการถอดรหัสดังกล่าวเริ่มต้นเมื่อ LINE-1 ที่หลุดออกมา มีการขาดหายไปของลำดับเบสที่สำคัญในช่วง 100 คู่เบสแรกของ 5'UTR ส่งผลให้เกิดการส่งออกจากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาสซึม ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีการแปลรหัสได้เป็นโปรตีนของ LINE-1 จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ORF1p ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่จับกับ RNA และ ORF2p เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า ORF2p สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง

endonuclease และ reverse transcriptase หลังจากนั้น ORF1p และ ORF2p สามารถจับกับ mRNA ของ LINE-1 ทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นสารประกอบ ribonucleoprotein เพื่อเข้าไปยังนิวเคลียส โดยโปรตีน ORF1p และ ORF2p มีบริเวณของ cis มากเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ของ RNA อย่างจำเพาะและสามารถเพิ่มจำนวนของ LINE-1 ให้มากขึ้น ขั้นตอนสุดท้ายของการเกิดกระบวนการเคลื่อนที่ของ LINE-1 เรียกว่าขั้นตอน target-primed reverse transcription (TPRT) ซึ่งกระบวนการนี้เริ่มต้นเมื่อ EN domain ของ ORF2p เกิดรอยขาดของ genomic DNA ที่บริเวณเป้าหมาย ซึ่งลำดับเบสสำหรับ EN domain คือ 5'-TTT/A-3' โดยการตัดที่บริเวณลำดับเบสนี้ทำให้เกิดหมู่ 3'OH หลังจากนั้น 3'OH จึงถูก ORF2p RT domain นำไปเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดกระบวนการ reverse transcription ของ LINE-1 mRNA โดยเริ่มต้นจาก poly (A) tail และต่อขยายไปทางด้านปลาย 5'ของ mRNA สุดท้าย complementary strand ได้รับการสังเคราะห์และบริเวณที่เกิดช่องว่างได้ผ่านกลไกการซ่อมแซม ซึ่งกลไกดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดส่งผลให้เกิดเป็น LINE-1 ชุดใหม่แทรกอยู่ใน genomic DNA (46)



รูปที่ 4 การเคลื่อนที่ของ LINE-1 ในการสร้าง LINE-1 ตัวใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนในจีโนม

อย่างไรก็ตามการที่ LINE-1 มีขั้นตอนการเกิดหลายขั้นตอนนั้นเพื่อช่วยให้เซลล์ของมนุษย์มีการควบคุมการเกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยปกติกลไกการยับยั้งการทำงานของ LINE-1 มีหลายกลไกซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนของการเคลื่อนที่ของ LINE-1 โดยกลไกที่ปัจจุบันมีการศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับการคุม LINE-1 ได้แก่การเกิด CpG dinucleotide methylation ที่บริเวณ promoter ของ LINE-1 ซึ่งมีการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นที่สามารถยับยั้งการทำงานของ LINE-1 ได้แก่กระบวนการ histone modification และ chromatin remodeling (47) และโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ทำการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ LINE-1 หลังจากเกิดกระบวนการถอดรหัสทั้งในไซโทพลาซึมและนิวเคลียส (50)

จากการศึกษาการทำงานของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งหลายการศึกษาส่วนมากเป็นเนื้องอกที่เกิดขึ้นบริเวณเยื่อบุผิว โดยระดับการเคลื่อนที่ของ LINE-1 สูงที่สุด พบในมะเร็งหลายชนิดได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งปอด (51), (52) ในส่วนของการเคลื่อนที่ของ LINE-1 ที่มีระดับปานกลางได้แก่มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งตับอ่อน (53), (54) มะเร็งรังไข่ และมะเร็งต่อมลูกหมาก (51) เป็นต้น และมะเร็งที่มีระดับการเคลื่อนที่ของ LINE-1 ต่ำแต่สามารถวัดค่าได้ ได้แก่มะเร็งกระดุก มะเร็งเต้านม (55) และมะเร็งตับ (56) เป็นต้น นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษากระบวนการทำงานรวมถึงกลไกของ LINE-1 ที่ส่งผลต่อการเจริญของเนื้องอกหลายชนิด พบว่ากระบวนการเกิด promoter methylation ดังที่ได้กล่าวข้างต้นมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของ LINE-1 ดังนั้นจึงมีหลายงานวิจัยชี้ให้เห็นว่ากระบวนการเกิด hypomethylation ของ LINE-1 เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดการกระตุ้นซ้ำที่ส่งผลให้เกิดการเจริญของเนื้องอก สำหรับบทบาทหน้าที่ของ LINE-1 ต่อการเกิดมะเร็ง หลายงานวิจัยอภิปรายว่า LINE-1 เป็นตัวบ่งชี้ชนิดหนึ่งที่สามารถอธิบายถึงระดับการเกิด overall global hypomethylation (56) และเกี่ยวข้องกับ retrotransposition โดยที่การเพิ่มของ LINE-1 อาจส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เปลี่ยนแปลงไป (49) ซึ่งเป็นผลมาจากชนิดของเซลล์และการปรับลักษณะของ LINE-1 (57) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การเพิ่มของ LINE-1 ส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกยีนเป้าหมาย (58) และได้รับการกระตุ้นซ้ำในเซลล์มะเร็ง เป็นเหตุให้เกิดความเสียหายของจีโนมและการเปลี่ยนแปลงไปของ epigenetic นอกจากนี้การแสดงออกของ LINE-1 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้องอกในมะเร็งบางชนิด ซึ่ง Ogino และคณะ รายงานว่าการเกิด LINE-1 hypomethylation เป็นผลที่แสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของโครโมโซม และมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำลงของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (59) สอดคล้องกับการศึกษาในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (60, 61) จึงทำให้ LINE-1 อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้วินิจฉัยโรคมะเร็งเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนในบางชนิดได้ (15) นอกจากนี้มีการอภิปรายผลการศึกษาจากหลายงานวิจัยเกี่ยวกับ LINE-1 ว่าเป็นตัวขับเคลื่อนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง โดยในงานวิจัยของ Miki และคณะ พบว่าการเกิด LINE-1 ชุดใหม่ในจีโนมทำให้เกิด

ความเสียหายต่อบริเวณ exon ของ APC tumor suppressor gene ส่งผลให้เกิดการเจริญของมะเร็ง อย่างไรก็ตามบทบาทการเพิ่มจำนวนของ LINE-1 ในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (62) อีกทั้งมีการศึกษาการเคลื่อนที่ของ LINE-1 ที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนของ Shukla และคณะ ทำการศึกษาในโรคมะเร็งตับ พบว่าการเพิ่มจำนวนชุดของ LINE-1 ในยีน ST18 ซึ่งทำให้ตัวยับยั้งที่ควบคุม cis element เสียหายส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน ST18 มากขึ้น และทำการสรุปผลว่าเป็น proto-oncogene ที่มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนชุดของ LINE-1 ใน ST18 มีผลทำให้เกิดการสร้างและการคงสภาพของเนื้องอก (56)

Short Interspersed nuclear element (SINE หรือ Alu)

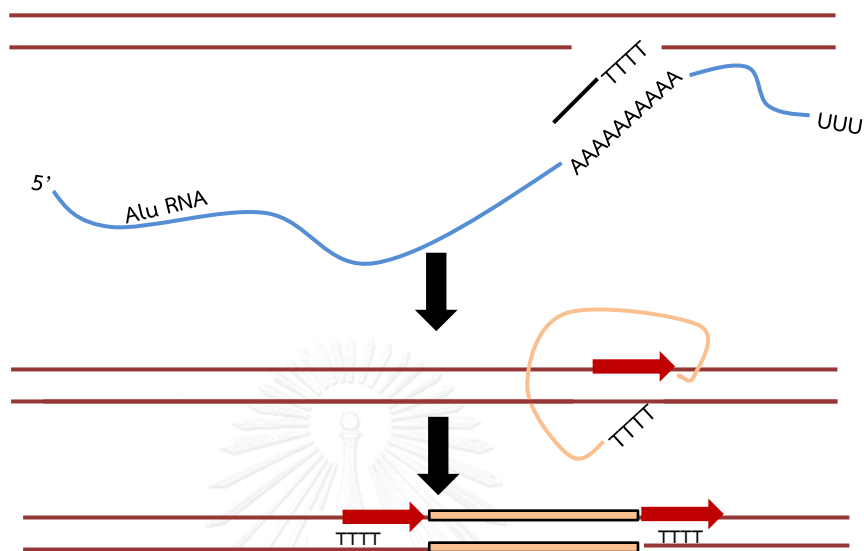
Alu คือ retrotransposon ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มของ short interspersed nuclear element (SINE) โดยมาจาก 7SL RNA gene ซึ่งเป็นรหัสของส่วนประกอบ RNA ใน signal recognition particle (SRP) เกี่ยวข้องกับการเกิด translocation ของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนตัวใหม่ (24) นอกจากนี้ Alu element เป็น retrotransposon ที่พบจำนวนมากกว่า 1 ล้านซ้ำ ซึ่งมากที่สุดได้ในจีโนมของมนุษย์ (25) คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 11 แต่เป็น repetitive element ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเองได้ ต้องอาศัยการทำงานจาก LINE-1 เป็นหลัก ซึ่ง Alu มีการสร้าง RNA polymerase III ของ RNA ที่ถอดรหัสแล้วในระดับต่ำ ส่งผลให้เกิดกระบวนการ retrotransposition นอกจากนี้ Alu element มีผลต่อการแสดงออกของยีน ประกอบด้วย polyadenylation splicing และ ADAR editing (63), (64) โครงสร้างของ Alu มีความยาวประมาณ 280 คู่เบส ประกอบด้วย enhancer element, transcriptional signals โดยเชื่อมกับส่วนของ A rich region และ poly (A) tail ซึ่งส่วนของ poly (A) tail นี้มีบทบาทต่อกลไกการเพิ่มจำนวนของ Alu ดังแสดงในรูปที่ 5 (65)



รูปที่ 5 โครงสร้างของ Alu ที่ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ enhancer element transcriptional signals และปลาย 3'UTR มีส่วน poly(A) tail (65)

นอกจากนี้ภายใน promoter ของ Alu มี RNA polymerase III ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัสที่บริเวณจุดเริ่มต้นของ Alu element และผลิต RNA ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนของ Alu element อย่างไรก็ตาม Alu element ไม่มี terminator ที่ใช้ในการหยุดกระบวนการถอดรหัส ดังนั้น Alu ที่ถอดรหัสแล้วจึงหยุดกระบวนการที่ตำแหน่งใกล้กับจีโนมโดยใช้

ตำแหน่งลำดับเบส TTTT เป็นตัวหยุดกระบวนการถอดรหัส สำหรับกลไกการแทรก Alu element สายใหม่เข้าไปยัง DNA เป้าหมาย ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 กลไกการเกิด reverse transcription ของ Alu element

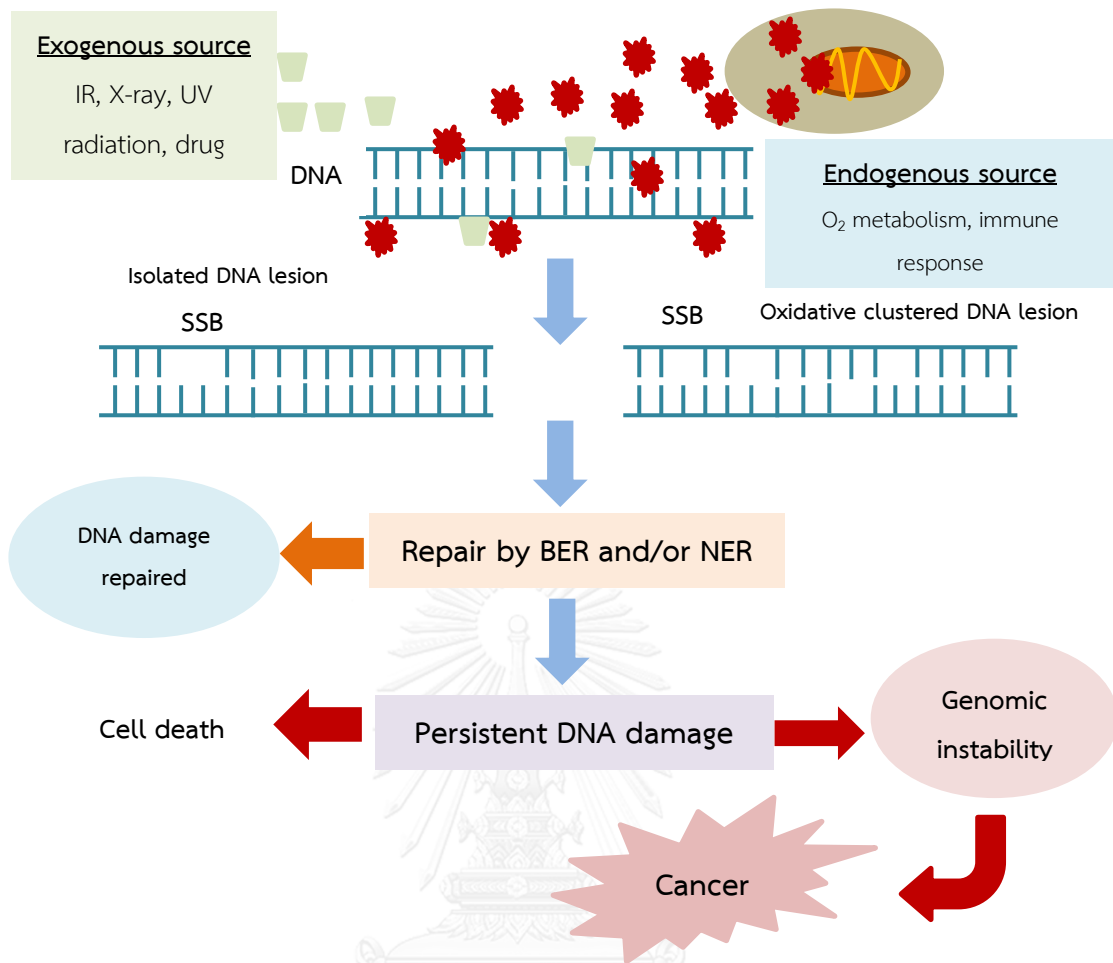
กระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่ Alu RNA นำ ORF2p ที่ได้จากการแปลรหัสของ LINE-1 เข้ามายังบริเวณ DNA เป้าหมาย หลังจากนั้นเกิดการ reverse transcription เป็น cDNA copy แล้วเกิดการแทรกของ Alu สายใหม่เข้าไปยัง target DNA ทำให้บริเวณดังกล่าวอาจเป็นแหล่งสะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ นำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็งได้อีกด้วย ถึงแม้ว่าการเพิ่มจำนวนของ Alu element ขึ้นกับ ORF2p จาก LINE-1 แต่ Alu สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการของ LINE-1 ก่อน เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ LINE-1 ต้องอาศัยทั้ง ORF1p และ ORF2p ในส่วนของ Alu ต้องการเพียง ORF2p จาก LINE-1 เท่านั้น ด้วยเหตุนี้แสดงให้เห็นว่า Alu เป็น retrotransposon ที่มีความเกี่ยวข้องกับหลายโรค (63) นอกจากนี้ในส่วนของ CpG residue พบว่ามี Alu element จำนวนมาก ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด methylation คิดเป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 25 ในจีโนม (64) เนื่องจาก CpG ที่เกิด methylation สามารถเกิดการกลายพันธุ์เป็น TpG ส่วนมากการเกิด Alu methylation จึงเกิดใน element ที่เพิ่งได้รับการสร้างขึ้นใหม่ นอกจากนี้ระดับการเกิด Alu methylation มีระดับการเกิดที่แตกต่างกันในแต่ละ tissue โดยส่วนมากพบว่าในเนื้อเยื่อหลายชนิดมีระดับการเกิด Alu methylation ที่ลดลง อีกทั้งมีการคาดการณ์ว่า Alu element อาจเป็นแหล่งที่พบ CpG ใหม่ที่สามารถควบคุมการทำงานของยีนข้างเคียง (66) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในเซลล์ร่างกายที่ปกติมีการเกิด Alu methylation

ค่อนข้างสูง ดังนั้นการเกิด Alu methylation ที่เปลี่ยนแปลงไปอาจส่งผลถึงการทำงานของ Alu element ที่ผิดปกติ จึงทำให้มีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป และเกิดความไม่เสถียรของจีโนม ซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญของโรคมะเร็ง [38] ซึ่งการศึกษาระดับการเกิด Alu methylation มีการศึกษาในมะเร็งหลายชนิด เช่น การศึกษาในมะเร็งสมองชนิด glioma โดยทำการศึกษาใน cell-free DNA พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในมะเร็ง glioma ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็น benign tumor และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี และเมื่อทำการศึกษาในแต่ละประเภทโรคของผู้ป่วยมะเร็ง glioma พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง glioblastoma and gliosarcoma รวมถึง anaplastic astrocytoma มีการเกิด Alu hypomethylation เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้เมื่อแบ่งตามความรุนแรงของมะเร็ง (low grade และ high grade) พบว่าในมะเร็ง high grade มีระดับการเกิด Alu methylation ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง low grade และกลุ่มควบคุม และจากการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu methylation กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง glioma พบว่าที่ระดับ Alu methylation น้อยกว่าร้อยละ 50 มีอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยต่ำที่สุด (67) นอกจากนี้มีการศึกษาในมะเร็งตับอ่อนโดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าร้อยละการเกิด Alu methylation ของยีนเป้าหมายเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง (PMR) ในมะเร็งตับอ่อนมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับอ่อน (68)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) มหาวิทยาลัย

ในภาวะปกติเมแทบอลิซึมของร่างกายมีการสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) :ซึ่งส่งผลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดย ROS ประกอบด้วยอนุพันธ์จากออกซิเจน ได้แก่ superoxide ($O_2^{\cdot-}$) hydroxyl radical (OH^{\cdot}) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen (O_2) (69) ดังนั้นร่างกายจึงมีสารต่อต้านและกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านี้เพื่อลดการสะสมที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ โดยสารที่สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ที่ทำลาย $O_2^{\cdot-}$ ได้เป็น H_2O_2 และ O_2^{\cdot} และในการกำจัด H_2O_2 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ catalase ซึ่งไม่ต้องการ cofactor ในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถสลาย H_2O_2 ได้เป็น H_2O และ O_2^{\cdot} กระบวนการดังกล่าวพบในทุกเนื้อเยื่อของร่างกาย และการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณ H_2O_2 ชนิดที่สองคือ glutathione peroxidase (GSHPx) ทำการสลาย H_2O_2 ได้เป็น H_2O โดยอาศัย glutathione (GSH) เป็น cofactor และการสลายด้วยเอนไซม์ดังกล่าวเป็นผล

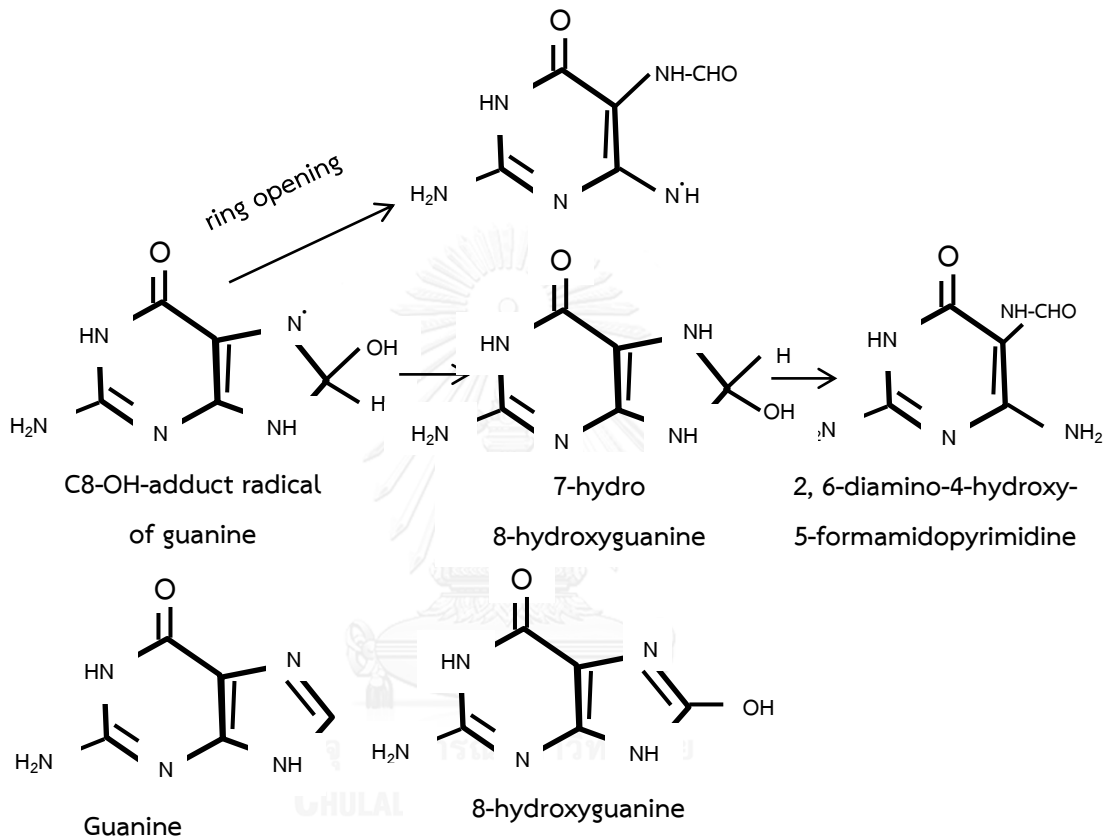
มาจากการเกิดออกซิเดชันของ oxidized glutathione (GSSG) นอกจากนี้เอนไซม์ GSHPx มีองค์ประกอบเป็น selenium อยู่ที่บริเวณตรงกลางของโครงสร้าง และพบได้ทั่วไปในไซโทพลาซึมของเซลล์ เอนไซม์ GSHPx แตกต่างจาก catalase ที่เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ถึงแม้ว่ามีปริมาณ H_2O_2 น้อยก็ตาม แต่ต้องอาศัยปริมาณของ GSH สูง ในบางกรณี ROS มีบทบาทสำคัญในเรื่องของหน้าที่สำคัญทางชีววิทยา อย่างไรก็ตาม ROS ถือว่าเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ในร่างกาย (70) ถึงแม้ว่าในร่างกายมีกระบวนการกำจัดสารอนุมูลอิสระออกจากเซลล์เพื่อคงสภาพสมดุลของร่างกาย แต่ ROS มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคต่างๆ เมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดตีตัน โรคข้อเข่าเสื่อม โรคทางระบบประสาท เป็นต้น (71) อย่างไรก็ตาม ROS ทุกชนิดสามารถจับกับองค์ประกอบภายในเซลล์ได้ ยกตัวอย่างเช่น ไนโตรจีนัสเบสของดีเอ็นเอ หรือ deoxyribosyl backbone ส่งผลให้เบสและสายของดีเอ็นเอเกิดความเสียหายตามลำดับ ดังนั้นความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจาก ROS เกิดเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งในที่สุด (72), (73) ในทางเดียวกันการสะสมของเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายซึ่งไม่ได้รับการซ่อมแซม กล่าวคือความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด oxidative stress ส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ ดังแสดงในรูปที่ โดยที่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีโอกาสที่ได้รับสารหรือสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอ สารดังกล่าวมาจากทั้งภายนอกเซลล์ เช่น สิ่งแวดล้อม รังสี ยาที่ใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น หรือจากภายในเซลล์ เช่น oxidative stress ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยก่อให้เกิดออกซิเจน การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และการอักเสบ ส่งผลให้เกิดความเสียหายของ DNA และเกิด DNA adduct เมื่อเกิดความเสียหายจึงเหนี่ยวนำให้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เข้ามากำจัด ROS ได้แก่ สารที่อยู่ภายในเซลล์ประเภท glutathione และวิตามินซี และวิตามินอีรวมถึงเอนไซม์ที่มีความสามารถในการกำจัด ROS ได้แก่ SOD, catalase, GSHPx ถ้า DNA ที่ได้รับความเสียหายจากสารดังกล่าวได้รับการซ่อมแซมจากกระบวนการซ่อมแซม DNA ภายในเซลล์ ทำให้สามารถคงสภาพและทำงานได้ตามปกติ อย่างไรก็ตาม ถ้า DNA ที่ได้รับความเสียหายและไม่สามารถทำการซ่อมแซมได้นั้นจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ (cell death) หรือเกิดการกลายพันธุ์ ก่อให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม และเกิดมะเร็งได้ต่อไป (74)



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ (74)

การตรวจวิเคราะห์กลไกที่จำเพาะของภาวะเครียดออกซิเดชันต่อการเกิดกระบวนการสร้างมะเร็งยังไม่มีการศึกษาที่เพียงพอ แต่เชื่อว่าเกิดจาก 2 กลไกหลักที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง กลไกแรกคือ oxidative damage ควบคุมการเกิดมะเร็งผ่านทาง การแสดงออกของยีน โดยที่กระบวนการทางด้าน epigenetic โดยกระบวนการนี้ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น growth signal และกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของกระบวนการจัดเรียงโครโมโซม (chromosomal rearrangement) เป็นผลมาจากการซ่อมแซมเส้น DNA ที่ได้รับความเสียหายหรือลำดับเบสผิดพลาด เกิดการกลายพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น การแทนที่หรือขาดหายไปของเบส และกระบวนการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป จึงอาจส่งผลให้เกิดโรคมะเร็ง (75) กลไกที่สองคือ สารอนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เกิดพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยที่สารอนุมูลอิสระเหล่านี้ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเบสของ DNA ในยีนก่อให้เกิดมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) อย่างไรก็ตาม ในการตรวจวัดระดับ oxidative stress ส่วนมากทำการ

ตรวจวัด 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) โดยกลไกการสร้าง 8-OHdG ดังแสดงในรูปที่ 8 เนื่องจากเป็นสารที่มีรูปแบบโครงสร้างง่ายต่อการศึกษา และเป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์อาจเป็นผลมาจากการสร้าง 8-OHdG ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ transversion ของ GC เป็น TA นอกจากนี้ 8-OHdG มีการสูญเสียความจำเพาะในการจับคู่เบส การเพิ่มเบส adenine ตรงข้ามกับบริเวณที่เกิดความเสียหาย ดังนั้นจึงเหมาะกับการเป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็ง (76)



รูปที่ 8 โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่มาจาก C8-OH adduct ของเบส guanine โดยเกิดจาก radical ที่เป็น OH· เข้าไปทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 ของเบส guanine

จากที่กล่าวข้างต้นการตรวจวัดระดับของ oxidative stress นิยมตรวจวัดปริมาณของ 8-OHdG โดยการศึกษาที่ผ่านมามีการศึกษาในโรคมะเร็งหลายชนิด จากการศึกษาของ Matsui และคณะ ทำการตรวจวัดปริมาณ 8-OHdG ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography-electrochemical detector (HPLC-ECD) ผลการศึกษาพบว่า ระดับ 8-OHdG ใน DNA ของชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมในผู้ป่วยมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อปกติข้างเคียง (non-neoplastic adjacent tissue) (77) สอดคล้องกับการศึกษาของการศึกษาของ Musarrat และคณะ พบว่าระดับ 8-OHdG ในมะเร็งเต้านมมีระดับสูง

กว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (78) นอกจากนี้มีการศึกษาในมะเร็งปากมดลูก ซึ่งทำการตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก พบว่าระดับการเกิด 8-OHdG ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมีค่าสูงขึ้นจากการตรวจวัดในมะเร็งชนิด low-grade ไปยัง high grade dysplasia อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด 8-OHdG กับ papillomavirus (79) อีกทั้งมีการตรวจวัดระดับการเกิด 8-OHdG ในมะเร็งอีกหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (80) มะเร็งกระเพาะอาหาร (81) มะเร็งตับ (82) มะเร็งปอด (83) เป็นต้น ซึ่งให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ผู้ป่วยโรคมะเร็งเหล่านี้มีระดับ 8-OHdG สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชันและการเกิด DNA methylation

นอกจาก ROS ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุศาสตร์แล้ว พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางด้าน epigenetic มีผลมาจาก ROS เช่นกัน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลต่อจีโนมในมนุษย์อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง (84) โดยการผลิต ROS ขึ้นนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิด DNA methylation กล่าวคือ DNA ที่เสียหายจาก hydroxyl radical ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น คือ 8-OHdG ส่งผลให้เกิดกระบวนการ DNA methylation ลดลง ซึ่ง 8-OHdG ไปรบกวนความสามารถของดีเอ็นเอที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ดังนั้นจึงทำให้เกิด global hypomethylation (85) นอกจากนี้การเกิด oxidative stress ซึ่งเหนี่ยวนำการสร้าง ROS ทำให้กลไก hypermethylation ในยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ผิดปกติที่บริเวณ promoter จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีน (gene silencing) และเกิดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและกล้ามเนื้อ อายุระหว่าง 18-80 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดจากฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดหรือรังสีรักษา หรือเคยเข้ารับการผ่าตัดมาก่อน ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่ส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และผู้ป่วยโรคเรื้อรังชนิดอื่นๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น

2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

การศึกษาในครั้งนี้ใช้จำนวนกลุ่มประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนที่เข้ารับการผ่าตัดจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยสามารถคำนวณกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2}$$

n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

N = ขนาดของประชากรที่เกิดโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนในปี พ.ศ.2550

e = ระดับความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมรับได้ (5%)

$$n = \frac{41}{1 + 41(0.05)^2}$$

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 37 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน โดยมีความจำเป็นต้องเข้ารับการผ่าตัด ซึ่งเลือกเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้องอก

ของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียงที่ต้องผ่าตัดออกจากผู้ป่วยตามแผนการรักษาและตัวอย่างเลือด จึงสามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างน้อย 37 ตัวอย่าง โดยจำนวนประชากรและประเภทของโรคที่นำมาศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยจำแนกตามชนิดของโรค จำนวน 46 ราย

ชนิดของโรค musculoskeletal tumor	จำนวนผู้ป่วย (ราย)
Liposarcoma	11
Soft tissue sarcoma	4
Giant cell tumor (GCT)	4
Metastasis CA	4
Spindle cell tumor	4
Lipoma	3
Schwannoma	3
Osteosarcoma	2
Chondrosarcoma	2
Leiomyosarcoma	1
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST)	1
Chondroma	1
Hibernoma	1
Cholangiocarcinoma	1
Hemangioma	1
Hemangioendothelioma	1
Adrenocarcinoma	1
Fibromatosis	1
จำนวนรวม	46

3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- Balance (Satorius, Germany)
- Blade (Parabolar, Germany)
- Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- Cuvette
- Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Pyrex, USA)
- Digital timer
- Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- ELISA microplate reader (BIO-RAD model 3550, USA)
- Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
- Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- Mastercycler personal (Eppendorf, USA)
- Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- Multi-channel pipettor (Biohit, Finland)
- Microcentrifuge tube rack
- Motar and pestle
- NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Scientific: USA)
- pH meter (Eutech Cybernataics)
- Pipette rack (Autopack, USA)
- Power supply model 250 (BIO-RAD, USA)
- Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- Refrigerator (Sanyo, Japan)
- Spectrophotometer (BIO-RAD, USA)
- Stirring-magnetic bar
- Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco, USA)

- Water bath: Memmert WB45 (Mettler, German)

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (Equipments)

- Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)
- Clotted blood and EDTA tube (Vacuettee, Austria)
- Disposable gloves (Proglove, Thailand)
- Glass pipette: 1ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
- Kimwipes paper (Kimberly-Clark, Australia)
- Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
- Parafilm (American National Can, USA)
- Petri dish
- Pipette tip: 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Plastic wrap
- Polypropylene conical tube, sterile: 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
- PCR markers (BIO-RAD, USA)
- Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagents)

5.1 สารเคมีทั่วไป (General reagent)

- Agarose molecular grade (Sigma, USA)
- Boric acid (Emsure, Germany)
- 70% Ethanol (QRec, New Zealand)
- Ethidium bromide (Sigma, USA)
- Hydrochloric acid (Sigma, USA)
- RNA later™ (Qiagen, Germany)
- Tris (Calbiochem, USA)

5.2 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากชิ้นเนื้อเยื่อ (DNA extraction from tissues) (Vivantis, Malaysia)

- Absolute ethanol (QRec, New Zealand)
- Buffer TB

- Buffer TL
- Elution buffer
- Lysis enhancer
- Proteinase K
- Wash buffer

5.3 สารเคมีสำหรับสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (DNA extraction from peripheral blood leukocytes) (Vivantis, Malaysia)

- Elution buffer type 5
- Lysis buffer type 10
- Proteinase K
- 3X RBC lysis buffer
- Wash buffer type 6

5.4 สารเคมีสำหรับทำ bisulfite treatment (Zymo research, USA)

- CT conversion reagent
- M-binding buffer
- M-desulphonation buffer
- M-dilution buffer
- M-dissolving buffer
- M-elution buffer
- M-wash buffer

5.5 สารเคมีสำหรับทำ quantitative Combined bisulfite restriction analysis (qCOBRA)

- 1X Bovine serum albumin (BSA) (GE Healthcare, USA)
- 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTP) (Applied biosystem, USA)
- Distilled water
- 0.5 U Hotstar *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Germany)
- 25 mM MgCl₂ (Qiagen, Germany)
- Mineral oil
- 10X NEBuffer 3.1 (New England BioLabs, UK)

- 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 10 μ M Forward primer (Macrogen, Korea)
- 10 μ M Reverse primer (Macrogen, Korea)
- *Taq I* buffer (Thermo Scientific, USA)
- *Taq I* enzyme (Thermo Scientific, USA)
- *Tas I* enzyme (Thermo Scientific, USA)

5.6 สารเคมีสำหรับการเตรียม Polyacrylamide gel

- 40% Acrylamide (BIO-RAD, USA)
- 10% Ammonium persulfate (APS)
- Distilled water
- 6X loading dye (Fermentas, USA)
- 25 bp Marker (Promega, USA)
- 1X TBE buffer
- 10X TBE buffer
- Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amersham Bioscience, UK)

5.7 สารเคมีสำหรับการทำ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Trevigen, USA)

- Alkaline Phosphatase
- Anti 8-OHdG monoclonal solution
- Assay diluent
- 100X Cations
- DNase I
- Goat anti-Mouse IgG-HRP conjugate
- 0.2 M HCl
- PBST
- 8-OHdG standard
- TACS-Sapphire™

6. การเก็บรวบรวมข้อมูล

สำหรับข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการเก็บรวบรวมด้วยการจดบันทึกลงสมุดปฏิบัติการและบันทึกข้อมูลทั้งหมดลงในคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

7. การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

7.1 การเก็บชิ้นเนื้อเยื่อ

- 7.1.1 ทำการเก็บชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งและชิ้นเนื้อเยื่อปกติบริเวณข้างเคียงของผู้ป่วยโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน
- 7.1.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยมาตัดแบ่งและชั่งน้ำหนักให้แต่ละชิ้นหนักประมาณ 30 mg
- 7.1.3 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากข้อ 7.1.2 ใส่ใน microcentrifuge tube และเติมน้ำยารักษาสภาพ RNA ลงไป 300 μ l (สัดส่วน 10 μ l ต่อน้ำหนักชิ้นเนื้อ 1 mg)
- 7.1.4 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20°C เพื่อรอสกัด DNA ต่อไป

7.2 การศึกษา DNA methylation

7.2.1 การสกัดแยก DNA จากชิ้นเนื้องอกและเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง

- 7.2.1.1 นำชิ้นเนื้อเยื่อน้ำหนัก 30 mg จากชิ้นเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในน้ำยารักษาสภาพ RNA มาใส่ลงในโกร่งบด
- 7.2.1.2 บดชิ้นเนื้อเยื่อให้ละเอียดโดยใช้ครกและสากบดชิ้นเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว แล้วนำผงที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube หลังจากนั้นจึงเติม buffer TL ปริมาตร 250 μ l และ proteinase K ปริมาตร 20 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 12 μ l ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืนจนได้สารละลายใส)
- 7.2.1.3 ผสมสารละลายที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเติม buffer TB ปริมาตร 560 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วนำไปบ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที
- 7.2.1.4 เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 μ l แล้วจึงผสมให้เข้ากันทันที
- 7.2.1.5 ดูด lysate ปริมาตร 600 μ l นำไปใส่ใน spin column ที่ประกอบอยู่กับ collection tube หลังจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลว ที่อยู่ใน collection tube ออก ทำซ้ำจน lysate หมด

- 7.2.1.6 เติม wash buffer ปริมาตร 750 μl ลงใน spin column นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ใน collection tube ออก ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง
- 7.2.1.7 นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ออก ให้หมด เทของเหลวที่อยู่ใน collection tube ออก
- 7.2.1.8 เปลี่ยน spin column ใส่ collection tube ใหม่ เติม elution buffer ที่บ่มไว้ที่ 65°C ปริมาตร 200 μl ลงใน spin column membrane ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะ DNA ออกจาก membrane จึงได้สารละลาย DNA
- 7.2.1.9 นำ DNA ที่สกัดได้เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

7.2.2 การสกัดแยก DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes)

- 7.2.2.1 นำเลือดตัวอย่างเติม 3X RBC lysis buffer แล้วนำไปบ่มที่เครื่องเขย่า อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 7.2.2.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- 7.2.2.3 ดูดส่วนใสทิ้ง และผสมก่อนที่จะดูดตัวอย่างใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่
- 7.2.2.4 เติม proteinase K ปริมาตร 20 μl จากนั้นจึงเติม lysis buffer type 10 ปริมาตร 400 μl แล้วจึงผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที
- 7.2.2.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 7.2.2.6 เตรียม column และ collection tube แล้วจึงดูด lysate ใส่ลงใน column
- 7.2.2.7 นำ column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงดูดส่วนใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง
- 7.2.2.8 เติม lysis buffer type 10 ปริมาตร 500 μl ลงใน column แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 7.2.2.9 เติม wash buffer type 6 ปริมาตร 500 μl ลงใน column แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงปั่นเปล่าอีก 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 นาที
- 7.2.2.10 เตรียม microcentrifuge tube หลอดใหม่ เพื่อเก็บ DNA ที่สกัดได้
- 7.2.2.11 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

7.2.2.12 ทำการเก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำ qCOBRA LINE-1 และ qCOBRA Alu ต่อไป

7.2.3 การวัดปริมาณ DNA

วัดปริมาณ DNA ที่ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยที่ $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA

7.2.3.1 แบ่ง DNA ตัวอย่างมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อน DNase

7.2.3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

7.2.3.3 คำนวณหาปริมาณ DNA โดยที่ $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA และวัดคุณภาพ DNA จากสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ซึ่ง DNA ที่มีคุณภาพจะมีค่าระหว่างช่วง 1.8-2.0

7.2.4 นำ DNA มาทำ bisulfite treatment

ปรับค่าความเข้มข้นของ DNA ให้มีค่าความเข้มข้นเป็น 2.5 ng/ μl ปริมาตร 20 μl (50 ng) หลังจากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยากับ bisulfite โดยใช้ EZ 8 DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA)

7.2.5 quantitative Combined bisulfite restriction analysis

(qCOBRA) ของ LINE-1 และ Alu

7.2.5.1 ทำการเพิ่มจำนวนของ bisulfited DNA โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ COBRA LINE-1 และ COBRA Alu(25)

ชื่อ Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (คู่เบส)
LINE-1 forward primer	5'-GTTAAAGAAAGGGGTGAYGGT-3'	92
LINE-1 reverse primer	5'-AATACRCRRTTCTTAAACCRATCTA-3'	
Alu forward primer	5'-GGRGRGGTGGTTTARGTTTGTA-3'	133
Alu reverse primer	5'-CTAACTTTTTATATTTTTAATAAAAACRAAATTCACCA-3'	

7.2.5.2 ผสมสารที่ใช้สำหรับการทำ PCR โดยมีส่วนประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 สารเคมี และปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μl)	Final concentration
10X PCR buffer	1	-
200 mM dNTPs	0.2	40 mM
25 mM MgCl ₂	0.4	10 mM
20 μM primers (forward and reverse)	0.3	6 μM
0.5 U HotStar Taq DNA polymerase	0.1	-
Distilled water	7	-
50 ng bisulfite-treated DNA	1	-
ปริมาตรรวม		10

ตารางที่ 4 สารเคมี และปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA Alu

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μ l)	Final concentration
10X PCR buffer	1	-
200 mM dNTPs	0.2	40 mM
25 mM $MgCl_2$	0.4	10 mM
20 μ M primers (forward and reverse)	0.3	6 μ M
0.5 U HotStar Taq DNA polymerase	0.1	-
Distilled water	7	-
50 ng bisulfite-treated DNA	1	-
ปริมาตรรวม		10

7.2.5.3 นำ master mix ที่ผสมจากข้อ 7.2.5.2 ใส่ลงใน tube สำหรับทำ PCR แล้วจึงดูด DNA template ใส่ในขั้นตอนสุดท้าย

7.2.5.4 นำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR โดยใช้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA LINE-1

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา	เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (นาที)
95 °C initial activation	15.00
95 °C denaturation	0.45
55 °C annealing	0.45
72 °C extension	0.45
72 °C final extension	7.00

40 รอบ

ตารางที่ 6 สภาวะและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ COBRA Alu

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา	เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (นาที)	
95 °C initial activation	15.00	
95 °C denaturation	0.45	40 รอบ
57 °C annealing	0.45	
72 °C extension	0.45	
72 °C final extension	7.00	

7.2.6 การวิเคราะห์รูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน

- 7.2.6.1 หลังจากทำการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR จึงทำการตัด PCR product ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยที่ LINE-1 ตัดด้วยเอนไซม์ 2 U *TaqI* และ 8 U *TasI* ใน สารละลาย NEBuffer 3.1 ดังแสดงในตารางที่ 6 ในขณะที่ Alu ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 2 U *TaqI* ในสารละลาย *TaqI* buffer ดังแสดงในตารางที่ 7
- 7.2.6.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ซ้ำคืน ซึ่ง *TaqI* มีตำแหน่ง restriction site คือ 5' TCGA 3' และ 3' AGCT 5' ในส่วนของ *TasI* มีตำแหน่ง restriction site คือ 5' AATT 3' และ 3' TTAA 5'
- 7.2.6.3 นำมาวิเคราะห์รูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel สารที่ใช้เตรียมดังแสดงในตารางที่ 8 หลังจากนั้นนำ PCR product 10 µl ผสมกับ 6X loading dye 6 µl แล้วจึงหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้ แล้วนำมาผ่านการแยกวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 0.4 แอมแปร์ เป็นเวลา 60 นาที นำเจลที่ได้ย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที
- 7.2.6.4 วัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (band intensity) ด้วยเครื่อง Molecular Imager Gel Doc ด้วยโปรแกรม Image Lab (Bio-Rad, Begoniastraat, Belgium) ขนาดของ PCR product เทียบได้จาก 25 bp ladder โดย Alu สามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน ประกอบด้วยขนาด 133, 90, 75, 58, 43 คู่เบส ในส่วนของ LINE-1 สามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส

7.2.6.5 การวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงถึงรูปแบบการเกิด methylation สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

สูตรการคำนวณรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันใน Alu

กำหนดให้ A แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 133 คู่เบส ทารด้วย 133

B แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 58 คู่เบส ทารด้วย 58

C แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 75 คู่เบส ทารด้วย 75

D แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 90 คู่เบส ทารด้วย 90

E แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 43 คู่เบส ทารด้วย 43

F แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 32 คู่เบส ทารด้วย 32

$$\text{ร้อยละของ Alu methylation (\% } ^m\text{C)} = 100X (E+B)/(2A+E+B+C+D)$$

$$\text{ร้อยละของ Alu hypermethylation (\% } ^m\text{C}^m\text{C)} = 100X F/(A+C+D+F)$$

$$\text{ร้อยละของ Partially Alu methylation (\% } ^u\text{C}^m\text{C)} = 100X C/(A+C+D+F)$$

$$(\% ^m\text{C}^u\text{C)} = 100X D/(A+C+D+F)$$

$$\text{ร้อยละของ Alu hypomethylation (\% } ^u\text{C}^u\text{C)} = 100X A/(A+C+D+F)$$

สูตรการคำนวณรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันใน LINE-1

กำหนดให้ A แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 92 คู่เบส ทารด้วย 92

B แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 60 คู่เบส ทารด้วย 56

C แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 50 คู่เบส ทารด้วย 48

D แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 42 คู่เบส ทารด้วย 40

E แทน ความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 32 คู่เบส ทารด้วย 28

F แทน [(D+E)-(B-C)] ทารด้วย 2

$$\text{ร้อยละของ LINE-1 methylation (\% } ^m\text{C)} = 100X (A+2C+F)/(2A+2B+2C+2F)$$

$$\text{ร้อยละของ LINE-1 hypermethylation (\% } ^m\text{C}^m\text{C)} = 100X (C/2)/[(C/2)+A+B+F]$$

$$\text{ร้อยละของ Partially LINE-1 methylation (\% } ^u\text{C}^m\text{C)} = 100X F/[(C/2)+A+B+F]$$

$$(\% ^m\text{C}^u\text{C)} = 100X A/[(C/2)+A+B+F]$$

$$\text{ร้อยละของ LINE-1 hypomethylation (\% } ^u\text{C}^u\text{C)} = 100X B/[(C/2)+A+B+F]$$

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ของ Alu

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μl)
<i>Taq I</i> buffer	1
2 U <i>Taq I</i> enzyme	0.2
Distilled water	0.8
PCR product	8
ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ของ LINE-1

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อตัวอย่าง (μl)
NEBuffer 3.1 buffer	1
10X BSA	0.1
2 U <i>Taq I</i> enzyme	0.2
8 U <i>Tas I</i> enzyme	0.2
Distilled water	0.5
PCR product	8
ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 8% non-denaturing polyacrylamide gel

สารเคมี	ปริมาตรต่อเจล
40% Polyacrylamide	1.2 ml
10X TBE buffer	600 μl
Distilled water	4.2 ml
TEMED	60 μl
Ammonium persulfate	6 μl

7.3 การวิเคราะห์ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ด้วยเทคนิค ELISA

การวิเคราะห์ระดับ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ของ DNA ในชิ้นเนื้อและพลาสมาของผู้ป่วยด้วยเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) มีขั้นตอนดังนี้

7.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอในชิ้นเนื้อ

7.3.1.1 สารละลาย DNA ที่สกัดได้ (ความเข้มข้นประมาณ 200-1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) นำมาเติมด้วย 100X Cations เพื่อปรับให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

7.3.1.2 เติม DNase I ปริมาตร 2 μl แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.1.3 เติม Alkaline phosphatase 2 μl แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับ 8-OHdG

7.3.2.1 นำ microplate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7.3.2.2 เตรียม serial dilutions ของสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG ดังแสดงในตารางที่ 10 รวมถึงเตรียมตัวอย่าง DNA และพลาสมา

ตารางที่ 10 การเจือจางสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG

8-OHdG concen	200 nM (56.7ng/ml)	100 nM (28.3 ng/ml)	50nM (14.2 ng/ml)	25 nM (7.1 ng/ml)	12.5 nM (3.54 ng/ml)	6.25 nM (1.77 ng/ml)	3.13 nM (0.89 ng/ml)
8-OHdG standard 20 μM	3 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl
Assay diluent	297 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl	150 μl

*ดัดแปลงจาก https://trivigen.com/docs/protocol/protocol_-192-4380K.pdf

7.3.2.3 เติมสารละลายมาตรฐาน 8-OHdG และตัวอย่างปริมาตร 25 μl ลงในแต่ละช่องของ microplate โดยช่องของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 nM และ blank ให้เติม Assay diluent

7.3.2.4 เติม anti 8-OHdG monoclonal solution ปริมาตร 25 μl ลงไปทุกช่องยกเว้นช่อง blank แต่ให้เติม Assay diluent ปริมาตร 25 μl ในช่อง blank แทน ผสมให้เข้ากัน โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปิด microplate ด้วยฟิล์มใส และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- 7.3.2.5 นำฟิล์มใสออกและทำการล้างด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง แล้วจึงซับ PBST ออกด้วยกระดาษทิชชู
- 7.3.2.6 เติม Goat anti-Mouse IgG-HRP conjugate ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 50 μ l ลงไปในแต่ละช่อง ยกเว้นช่อง blank ให้เติม Assay diluent ปริมาตร 50 μ l แทน จากนั้นปิดฟิล์มใสที่ microplate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ TACS-Sapphire™ มาวางไว้ที่อุณหภูมิ 25°C
- 7.3.2.7 นำฟิล์มใสออกและทำการล้างด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง แล้วจึงซับ PBST ออกด้วยกระดาษทิชชู
- 7.3.2.8 เติมสับสเตรท TACS-Sapphire™ ปริมาตร 50 μ l ลงไปในทุกช่องของ microplate แล้วจึงบ่มอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.2M HCl ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากันทันที
- 7.3.2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader
- 7.3.2.10 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของ 8-OHdG ทั้งในพลาสมา และ DNA ที่สกัดจากชิ้นเนื้อ โดยที่ค่าความเข้มข้นของ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อนำมาทำการ normalize ด้วย DNA หนึ่งหน่วย

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ชนิด cross-sectional prospective study เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในรูปแบบกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร ในกรณีที่มีข้อมูล มีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติใช้สถิติ Wilcoxon matched-pairs signed rank test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ได้แก่ การเปรียบเทียบระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในเนื้องอกเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง นอกจากนี้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ทำการเปรียบเทียบระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยกับผู้ที่มิสุขภาพดี โดยพบว่าการแจกแจงปกติจึงใช้สถิติ Mann-Whitney test และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยแบ่งตามความรุนแรงของเนื้องอกเป็น benign และ malignant ใช้สถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการวาดกราฟ ในส่วนของการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด methylation ในเนื้องอกและ peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยได้ทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ทดสอบจาก Pearson's

correlation นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ ROC curve และพื้นที่ใต้กราฟ (Area under curve; AUC) ของระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation เพื่อหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจวัดเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 อย่างไรก็ตามระดับการเกิด methylation ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคุณลักษณะที่อาจส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค เช่น อายุ เพศ และขนาดเนื้องอก เป็นต้น ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีความถดถอยเชิงเส้นตรง



บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนกับลักษณะข้อมูลทางคลินิก

การศึกษาระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation นั้นทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 46 ราย โดยทำการศึกษาในชิ้นเนื้องอก ชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และ peripheral blood leukocytes (PBL) ของผู้ป่วยรายเดียวกัน นอกจากนี้ข้อมูลลักษณะทางคลินิก เช่น อายุ เพศ และขนาดของเนื้องอกได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางคลินิกและระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด methylation และลักษณะข้อมูลทางคลินิก

คุณลักษณะ	ชิ้นเนื้องอก (N = 46)	Alu methylation		P	LINE-1 methylation		P
		Hypomethylation (N = 21)	Hypermethylation (N = 25)		Hypomethylation (N = 23)	Hypermethylation (N = 23)	
อายุ (ปี)	67.9 ± 19.2	54.5 ± 17.0	48.5 ± 14.8	0.452	54 ± 15.6	48 ± 16.5	0.140
เพศ							
ชาย	20 (43.5%)	10 (47.6%)	10 (40.0%)	0.604	9 (39.1%)	11 (47.8%)	0.552
หญิง	26 (56.5%)	11 (52.4%)	15 (60.0%)		14 (60.9%)	12 (52.2%)	
ขนาดเนื้องอก							
<= 5 ซม.	12 (26.1%)	7 (33.3%)	5 (20.0%)	0.305	7 (30.4%)	5 (21.7%)	0.502
> 5 ซม.	34 (73.9%)	14 (66.7%)	20 (80.0%)		16 (69.6%)	18 (78.3%)	

จากตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 46 ราย แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 20 ราย และเพศหญิงจำนวน 26 ราย โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 67.9±19.2 ปี เมื่อแบ่งตามขนาดของเนื้องอก พบว่า ผู้ป่วยจำนวน 12 รายมีขนาดของเนื้องอกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 เซนติเมตร และผู้ป่วยจำนวน 34 รายมีขนาดของเนื้องอกมากกว่า 5 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคุณลักษณะทางคลินิกโดยใช้ค่ามัธยฐานของระดับการเกิด methylation ในชิ้นเนื้อปกติข้างเคียงเป็นค่าแบ่งระดับการเกิด methylation พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยมีการเกิด Alu hypermethylation จำนวน 25 ราย โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยเท่ากับ 48.5±14.8 ปี เป็นเพศชาย 10 ราย (ร้อยละ 40) เพศ

หญิง 15 ราย (ร้อยละ 60) ซึ่งมีขนาดเนื้องอกมากกว่า 5 เซนติเมตร จำนวน 20 ราย (ร้อยละ 80) และขนาดของเนื้องอกน้อยกว่า 5 เซนติเมตร จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 20) ซึ่งในการวิเคราะห์ระดับการเกิด Alu methylation และข้อมูลลักษณะทางคลินิกนั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในส่วนของ LINE-1 methylation พบว่าเกิดทั้ง LINE-1 hypomethylation และ hypermethylation ในจำนวนที่เท่ากัน โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยใน 2 กลุ่ม คือ 54 ± 15.6 และ 48 ± 16.5 ปีตามลำดับ ซึ่งในกลุ่ม LINE-1 hypomethylation แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 9 ราย (ร้อยละ 39.1) และเพศหญิงจำนวน 14 ราย (ร้อยละ 60.9) ซึ่งมีขนาดของเนื้องอกมากกว่า 5 เซนติเมตร จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 69.6) และขนาดของเนื้องอกน้อยกว่า 5 เซนติเมตรจำนวน 7 ราย (ร้อยละ 30.4) ในส่วนของ LINE-1 hypermethylation ในผู้ป่วยแบ่งเป็นเพศชายจำนวน 11 ราย (ร้อยละ 47.8) และเพศหญิงจำนวน 12 ราย (ร้อยละ 52.2) ซึ่งมีขนาดของเนื้องอกมากกว่า 5 เซนติเมตรจำนวน 18 ราย (ร้อยละ 78.3) และขนาดเนื้องอกน้อยกว่า 5 เซนติเมตรจำนวน 5 ราย (ร้อยละ 21.7) โดยที่ระดับการเกิด LINE-1 methylation และลักษณะข้อมูลทางคลินิกไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับ Alu methylation

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation และข้อมูลลักษณะทางคลินิกในเนื้องอกของผู้ป่วยจำนวน 46 ราย โดยวิเคราะห์จากความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรง โดยจากการวิเคราะห์แสดงเป็นค่าดังนี้ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (β coefficient) ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) และค่าแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์แบบถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างระดับการเกิด methylation และลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

คุณลักษณะ	Alu methylation		LINE-1 methylation	
	β coefficient (95%CI)	P-value	β coefficient (95%CI)	P-value
อายุ	-0.089 (-0.45 to 0.25)	0.567	-0.006 (-0.17 to 0.16)	0.971
เพศ	-0.044 (-12.75 to 9.59)	0.777	-0.114 (-0.71 to 3.26)	0.461
ขนาดเนื้องอก	-0.062 (-1.11 to 0.74)	0.687	0.152 (-0.22 to 0.64)	0.322

จากตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยที่วิเคราะห์ในเนื้องอกกับลักษณะข้อมูลทางคลินิก ได้แก่ อายุ เพศ และขนาดของเนื้องอก พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การ

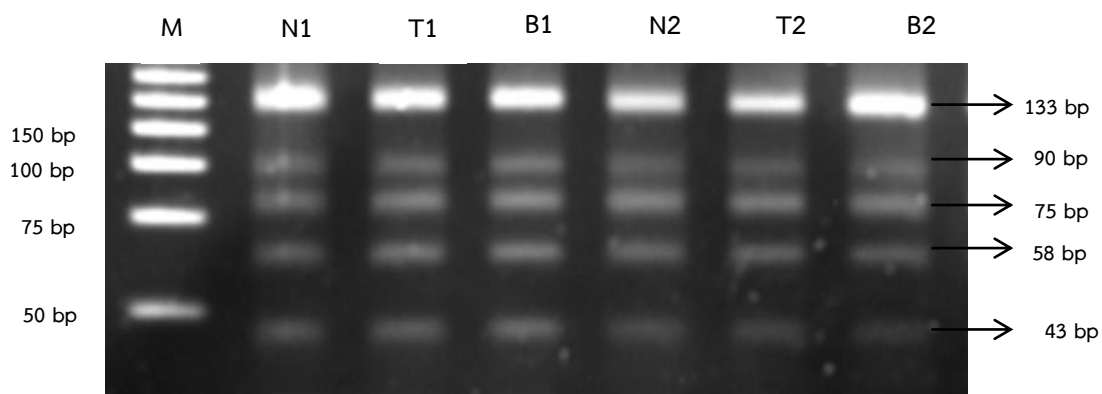
ถดถอยมาตรฐานของอายุเท่ากับ -0.089 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -0.45 ถึง 0.25 โดยที่ค่า P -value เท่ากับ 0.567 เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานของเพศ เท่ากับ -0.044 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -12.75 ถึง 9.59 และค่า P -value เท่ากับ 0.777 ในส่วนของขนาดของเนื้องอก พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานเท่ากับ -0.062 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -1.11 ถึง 0.74 และค่า P -value เท่ากับ 0.687 อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ใน LINE-1 methylation พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานเท่ากับ -0.006 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -0.17 ถึง 0.16 และค่า P -value เท่ากับ 0.971 ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานเท่ากับ -0.114 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -0.71 ถึง 3.26 และค่า P -value เท่ากับ 0.461 ในส่วนของขนาดเนื้องอกพบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐานเท่ากับ 0.152 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อยู่ในช่วงระหว่าง -0.22 ถึง 0.64 และค่า P -value เท่ากับ 0.322

2. การศึกษาระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ด้วยเทคนิค quantitative combine bisulfite restriction analysis (qCOBRA)

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues, non-neoplastic adjacent tissues และ peripheral blood leukocytes จำนวน 46 ราย โดยในการวิเคราะห์ทาง peripheral blood leukocytes กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี มีจำนวน 107 ราย

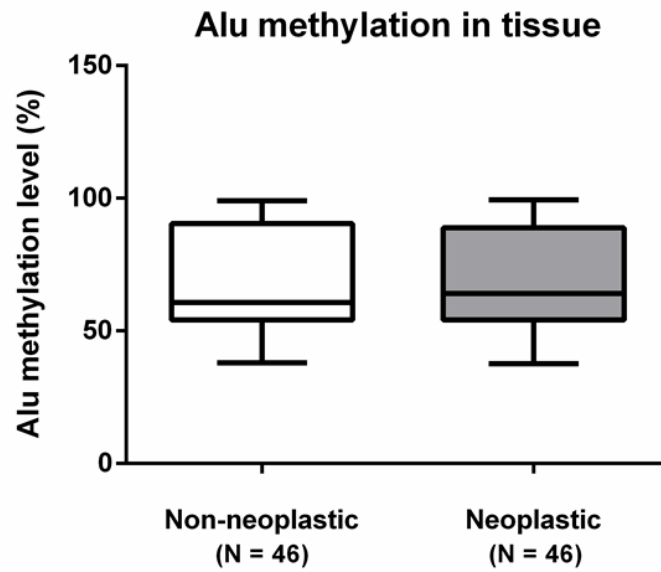
2.1 การศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

หลังจากที่วัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอแล้วนั้นจึงนำค่า methylation ที่ได้มาวิเคราะห์ผลตามสูตรที่ได้แสดงดังข้างต้น โดยรูปแบบการเกิด Alu methylation มี 6 รูปแบบ ประกอบด้วยขนาด 133, 90, 75, 58, 43 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 9

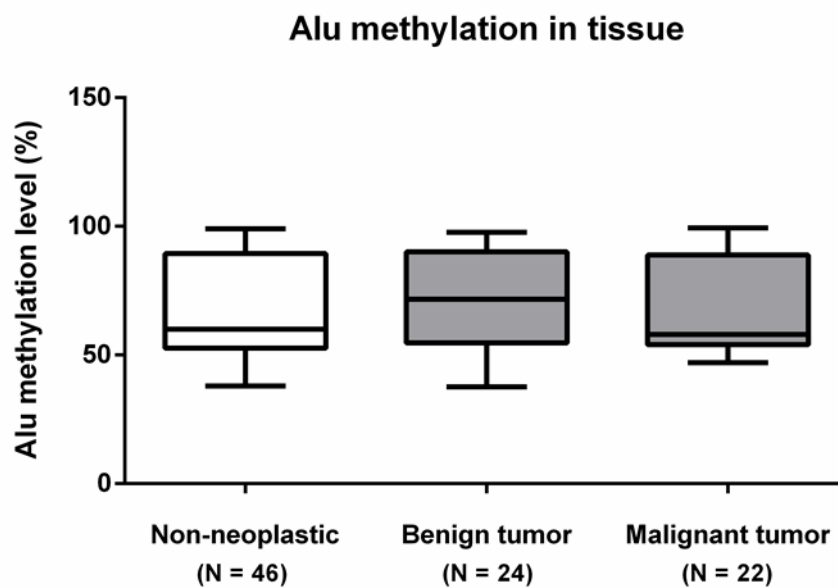


รูปที่ 9 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ Alu methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (M แทน 25 bp ladder, N แทน non-neoplastic adjacent tissues, T แทน neoplastic tissues, B แทน peripheral blood leukocytes และหมายเลข 1 และ 2 แทนลำดับผู้ป่วย)

จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าจากกลุ่มผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่ทำการศึกษาใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue นั้นพบว่า PCR product ที่ได้จากการทำ PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถเกิดรูปแบบของ Alu methylation ได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ ที่ขนาด 133, 90, 75, 58, 43 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ดังแสดงในรูปที่ 10 และเมื่อแบ่งประเภทตามความรุนแรงของเนื้องอก สามารถแบ่งได้เป็นเนื้องอกประเภท benign และ malignant ดังแสดงในรูปที่ 11

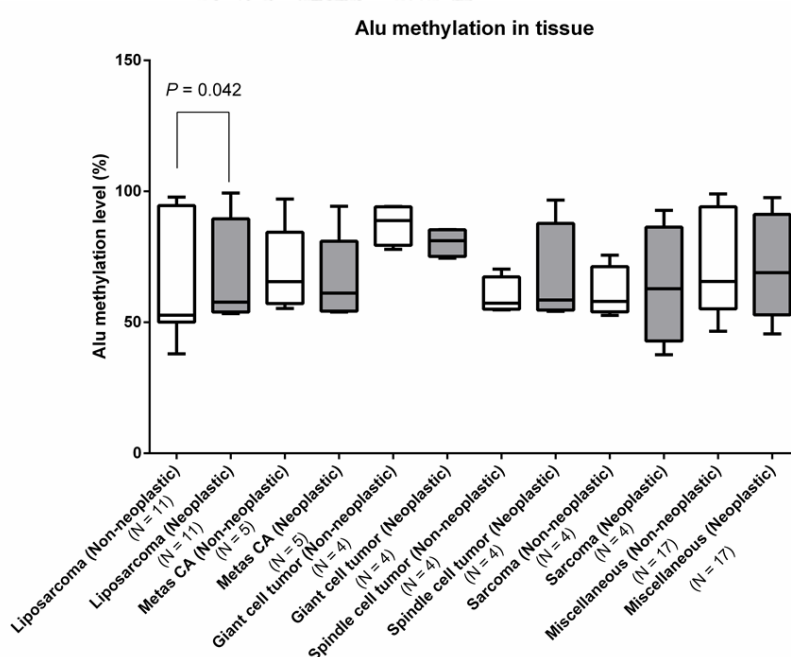


รูปที่ 10 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่วิเคราะห์ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues



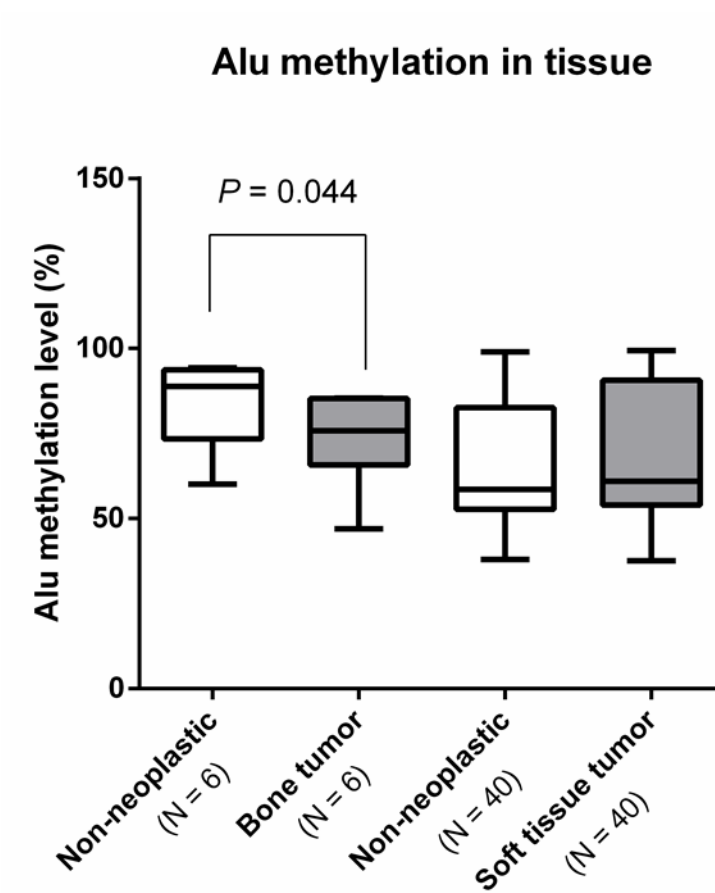
รูปที่ 11 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่วิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอก ได้แก่ เนื้องอก benign (N=24) และ เนื้องอก malignant (N=22) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

จากรูปที่ 10 และ 11 แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissues มีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues อย่างไรก็ตามระดับ Alu methylation ใน tissue พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.591$) โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ Wilcoxon matched-pairs signed rank test นอกจากนี้เมื่อแบ่งตามประเภทของเนื้องอกเป็นประเภท benign จำนวน 24 ราย และ เนื้องอก malignant จำนวน 22 รายด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.69$) นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งตามประเภทของเนื้องอกของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน โดยแบ่งเป็น liposarcoma 11 ราย, metas CA 5 ราย, giant cell tumor 4 ราย, spindle cell tumor 4 ราย, sarcoma 4 ราย และ อื่นๆ 17 ราย ด้วยสถิติ Wilcoxon matched-pairs signed rank test เปรียบเทียบระหว่าง neoplastic tissue และ non-neoplastic adjacent tissue ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่ามีเพียง neoplastic tissues ของผู้ป่วยโรค liposarcoma มีระดับการเกิด Alu methylation สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.042$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues โดยที่เนื้องอกประเภทอื่นไม่พบความแตกต่างทางสถิติใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues



รูปที่ 12 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย โดยแบ่งตามประเภทของโรคที่เกิดขึ้น ได้แก่ liposarcoma (N = 11) metas CA (N = 5) giant cell tumor (N = 4) spindle cell tumor (N = 4) sarcoma (N = 4) และ อื่นๆ (N = 17) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ของผู้ป่วยรายเดียวกัน

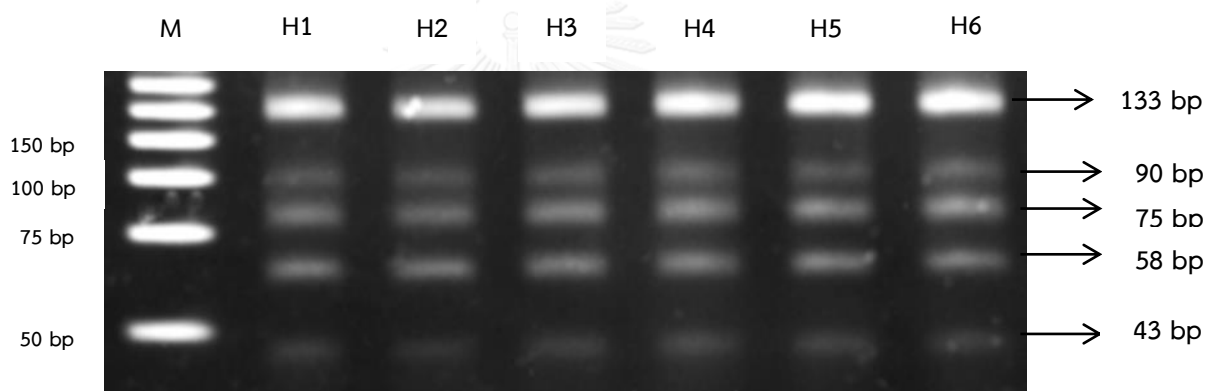
นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการจัดกลุ่มของโรค musculoskeletal tumor โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอก ได้แก่ เนื้องอกกระดูก (bone tumor) จำนวน 6 ราย และเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue tumor) จำนวน 40 ราย ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ paired *t*-test ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue ของ bone tumor มีระดับการเกิดต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.044$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของ neoplastic tissue ใน soft tissue sarcoma เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues



รูปที่ 13 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอก ได้แก่ bone tumor (N = 6) และ soft tissue tumor (N = 40) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ของผู้ป่วยรายเดียวกัน

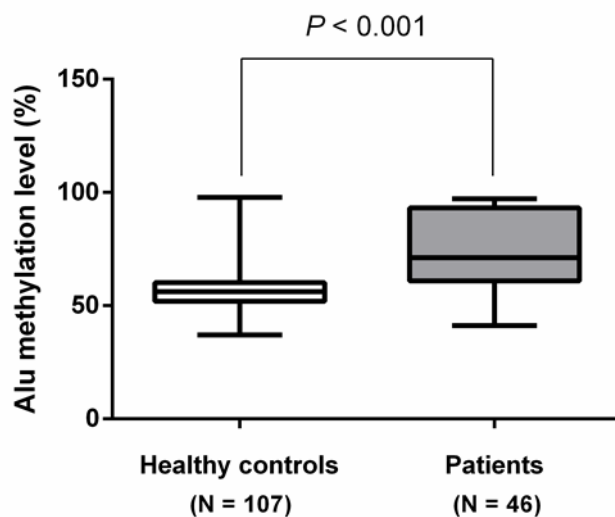
2.2 การศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes (PBL) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

นอกจากศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic tissue แล้วนั้น ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes ของกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 46 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 107 ราย ผลการวิเคราะห์แยกด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel ของกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 107 ราย สามารถแยกได้เป็น 5 รูปแบบ ประกอบด้วยขนาด 133, 90, 75, 58 และ 43 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 14 ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 15 พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ($P < 0.001$) ด้วยสถิติ Mann-Whitney test



รูปที่ 14 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ Alu methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (M แทน 25 bp ladder, H แทนกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีและหมายเลข 1 และ 2 แทนลำดับของกลุ่มควบคุม

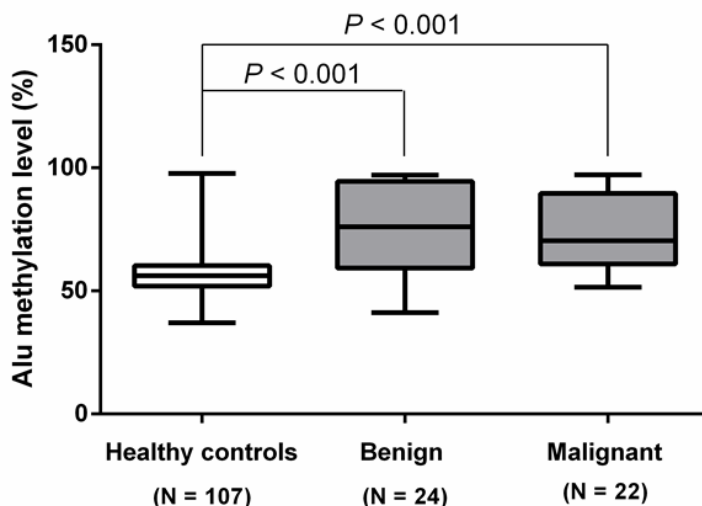
Alu methylation in peripheral blood leukocytes



รูปที่ 15 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) จำนวน 107 ราย

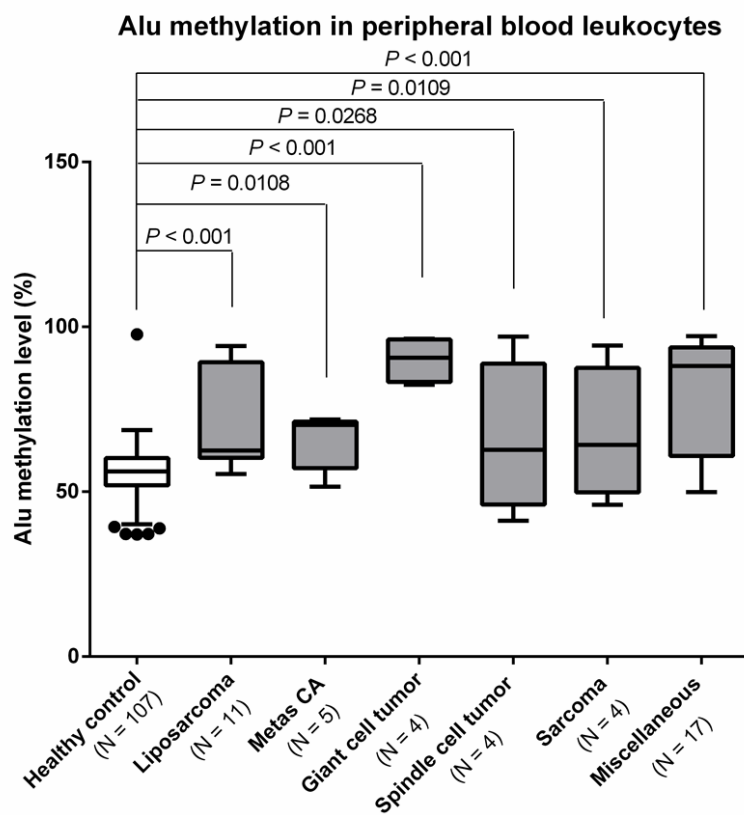
เมื่อแบ่งประเภทตามความรุนแรงของเนื้องอก ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าทั้ง benign จำนวน 22 ราย และ malignant จำนวน 24 ราย มีระดับการเกิด Alu methylation สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ดังแสดงในรูปที่ 16

Alu methylation in peripheral blood leukocytes



รูปที่ 16 ระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยที่ทำการวิเคราะห์จาก peripheral blood leukocytes จำนวน 46 ราย ซึ่งวิเคราะห์โดยแบ่งตามความรุนแรงของเนื้องอก ได้แก่ benign (N=24) และ malignant (N=22) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107)

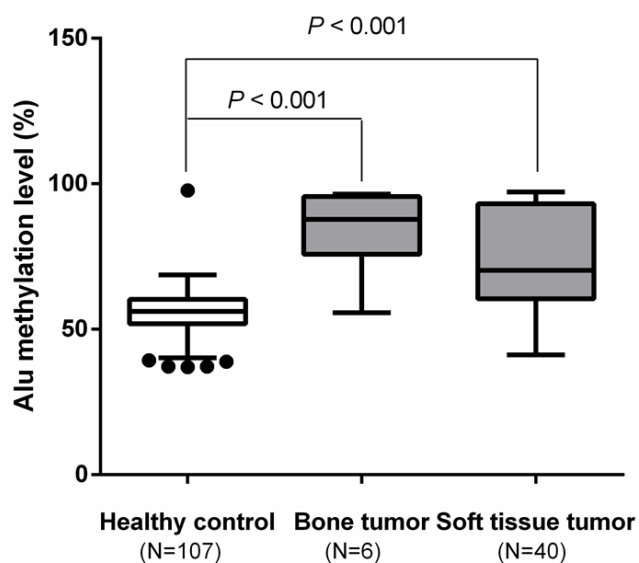
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes โดยจำแนกตามชนิดของโรค ได้แก่ liposarcoma (N=11) metas CA (N=5) giant cell tumor (N=4) spindle cell tumor (N=4) sarcoma (N=4) และอื่นๆ (N=17) พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในทุกชนิดของโรคมียค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107) โดย liposarcoma ($P < 0.001$) metas CA ($P = 0.0108$) giant cell tumor ($P < 0.001$) spindle cell tumor ($P = 0.0268$) sarcoma ($P = 0.0109$) และอื่นๆ ($P < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

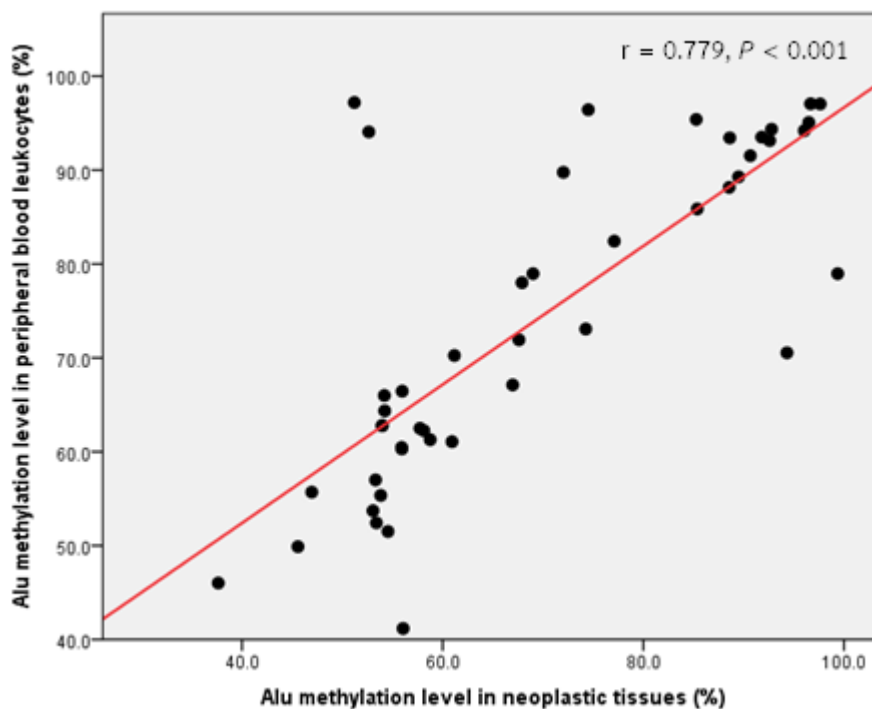
นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของต้นกำเนิดของโรค ได้แก่ bone tumor (N=6) และ soft tissue tumor (N=40) พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ทั้งใน bone tumor และ soft tissue tumor มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107) ดังแสดงในรูปที่ 18

Alu methylation in peripheral blood leukocytes



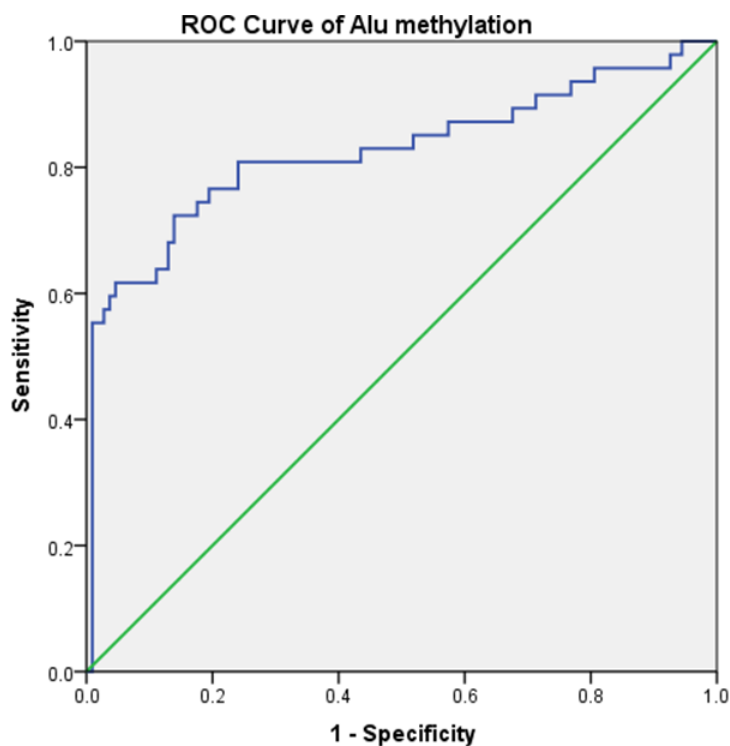
รูปที่ 18 ระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามต้นกำเนิดของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ได้แก่ bone tumor (N=6) และ soft tissue tumor (N=40) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107)

จากนั้นได้ศึกษาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร ซึ่งวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Pearson's correlation ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับการเกิด Alu methylation ระหว่าง neoplastic tissues กับ peripheral blood leukocytes ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

จากกราฟข้างต้น แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissues มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ peripheral blood leukocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.779$, $P<0.001$) ทำให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation สามารถตรวจวิเคราะห์ได้จาก peripheral blood leukocytes ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สะดวกรวดเร็วและผู้ป่วยเจ็บปวดน้อย (non-invasive biomarker) เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์จาก neoplastic tissue นอกจากนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำและถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย ทางคณะผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ด้วยการสร้างกราฟ Receiver Operator Characteristic (ROC curve) ดังแสดงในรูปที่ 20

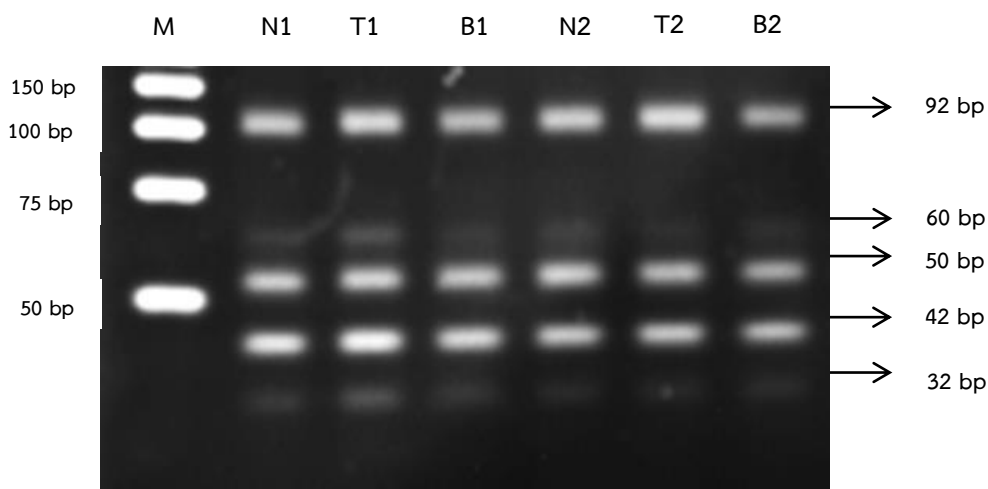


รูปที่ 20 กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes

จากกราฟ ROC curve ข้างต้น พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes มีความไวและความจำเพาะสูง (Area under curve = 0.825, จุด cut off ที่ 60.473 และ $P < 0.001$) แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes อาจสามารถเป็นตัวบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยโรค musculoskeletal tumor ได้

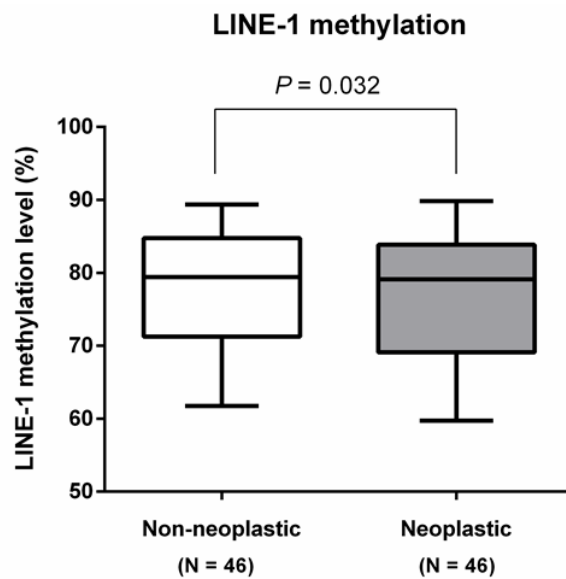
2.3 การศึกษาระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

ในส่วนของ LINE-1 หลังจากวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอแล้วนั้นจึงนำค่า methylation ที่ได้มาวิเคราะห์ผลตามสูตรที่ได้แสดงดังข้างต้น โดยรูปแบบการเกิด LINE-1 methylation มี 5 รูปแบบ ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42, และ 32 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 21



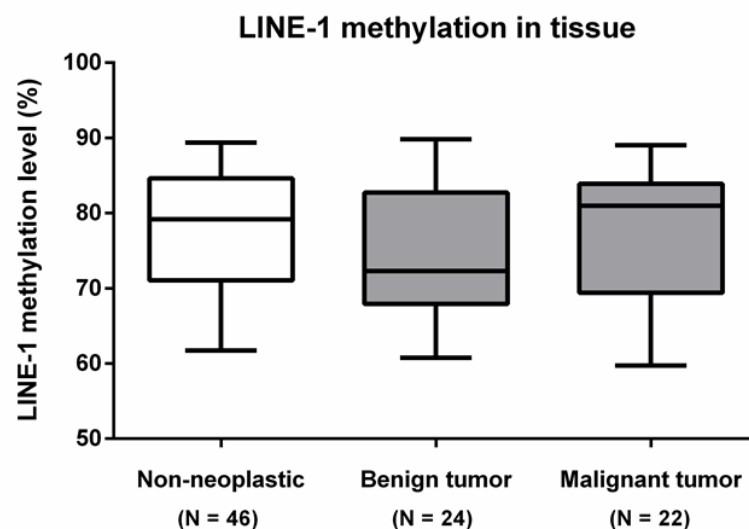
รูปที่ 21 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ LINE-1 methylation ที่ได้จากการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (M แทน 25 bp ladder, N แทน non-neoplastic adjacent tissue, T แทน neoplastic tissue, B แทน peripheral blood leukocytes และหมายเลข 1 และ 2 แทนลำดับผู้ป่วย)

จากรูปที่ 21 แสดงให้เห็นว่าจากกลุ่มผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่ทำการศึกษาใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue นั้น พบว่า PCR product ที่ได้จากการทำ PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถเกิดรูปแบบของ LINE-1 methylation ได้ทั้งหมด 5 รูปแบบ ที่ขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงคำนวณร้อยละของระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่วิเคราะห์ใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

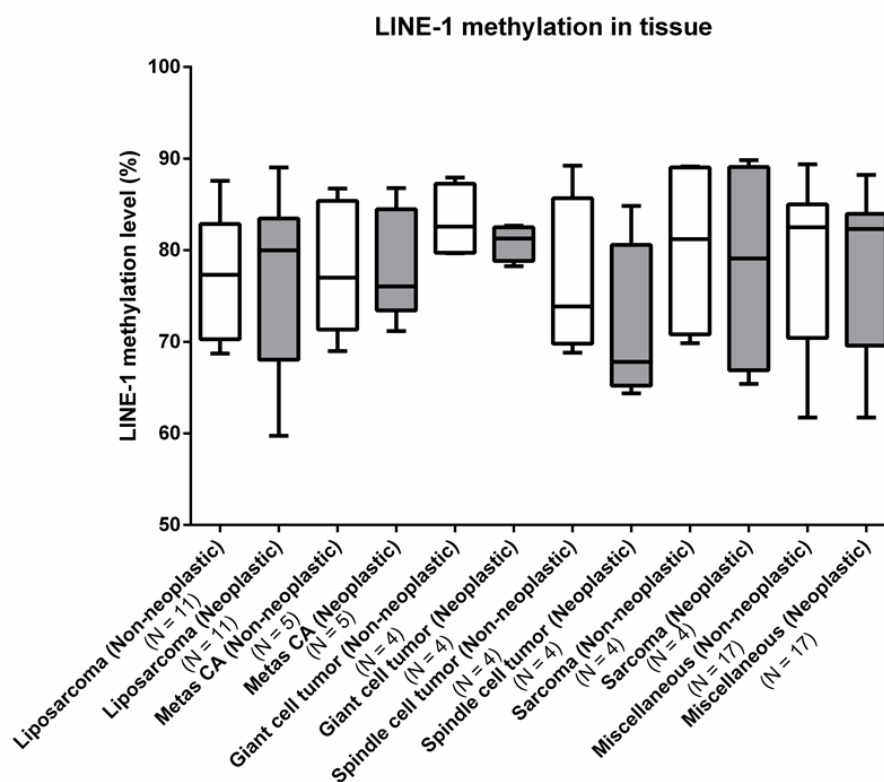
นอกจากนี้เมื่อแบ่งประเภทตามความรุนแรงของเนื้องอก โดยสามารถแบ่งเป็นเนื้องอกประเภท benign และ malignant ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ที่วิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอก ได้แก่ เนื้องอก benign (N=24) และเนื้องอก malignant (N=22) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

จากรูปที่ 22 และ 23 แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.032$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ Wilcoxon matched-pairs signed rank test และเมื่อแบ่งตามประเภทของเนื้องอกเป็นประเภท benign จำนวน 24 รายและ malignant จำนวน 22 ราย ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.482$)

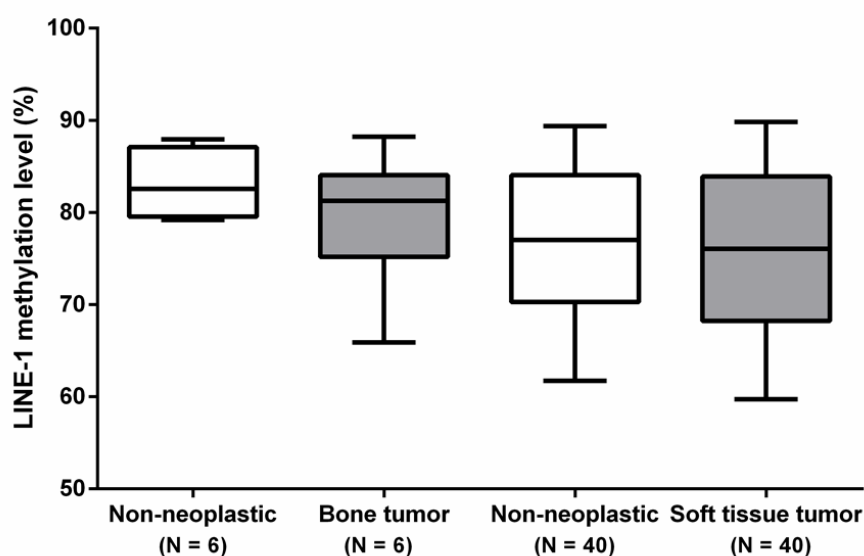
นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งตามประเภทของเนื้องอกของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน โดยแบ่งเป็น liposarcoma 11 ราย, metas CA 5 ราย, giant cell tumor 4 ราย, spindle cell tumor 4 ราย, sarcoma 4 ราย และอื่นๆ 17 ราย ด้วยสถิติ paired *t*-test เปรียบเทียบระหว่าง neoplastic tissue และ non-neoplastic adjacent tissue ในผู้ป่วยรายเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่าในแต่ละประเภทของโรคไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues



รูปที่ 24 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย โดยแบ่งตามประเภทของโรคที่เกิดขึ้น ได้แก่ liposarcoma (N = 11) metas CA (N = 5) giant cell tumor (N = 4) spindle cell tumor (N = 4) sarcoma (N = 4) และ อื่นๆ (N = 17) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ของผู้ป่วยรายเดียวกัน

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการจัดกลุ่มของโรค musculoskeletal tumor โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอก ได้แก่ เนื้องอกกระดูก (bone tumor) จำนวน 6 ราย และเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue tumor) จำนวน 40 ราย ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติ paired *t*-test ดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน bone tumor และ soft tissue tumor ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

LINE-1 methylation in tissue

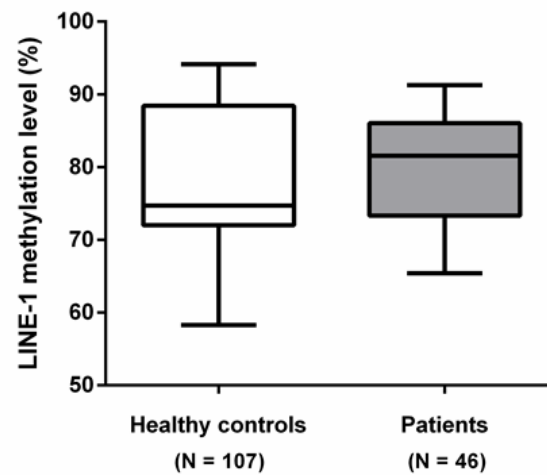


รูปที่ 25 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย โดยแบ่งตามต้นกำเนิดของเนื้องอก ได้แก่ bone tumor (N = 6) และ soft tissue tumor (N = 40) เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ของผู้ป่วยรายเดียวกัน

2.4 การศึกษาระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes (PBL) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

อย่างไรก็ตามทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes เช่นเดียวกันกับใน Alu methylation พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยมีแนวโน้มต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่มนี้ ($P=0.796$) ดังแสดงในรูปที่ 26

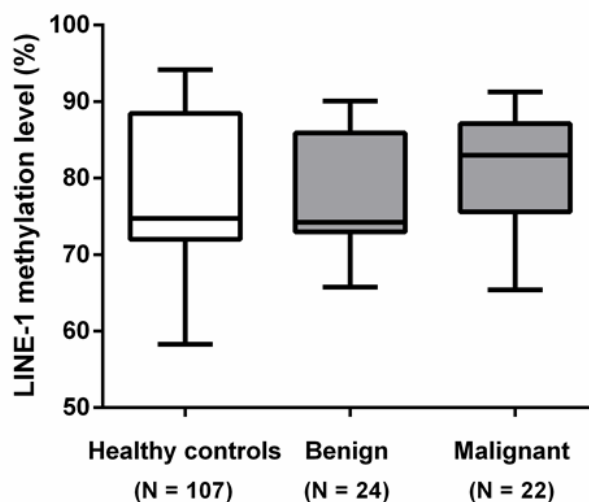
LINE-1 methylation (Peripheral blood leukocytes)



รูปที่ 26 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy controls) จำนวน 107 ราย

หลังจากนั้นจึงทำการแบ่งระดับการเกิด LINE-1 methylation ตามประเภทของ neoplastic tissue โดยแบ่งเป็นเนื้องอก benign จำนวน 24 ราย และ malignant จำนวน 22 ราย ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วย One-way ANOVA ดังแสดงในรูปที่ 27 โดยผลการศึกษา พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทำการแบ่งตามประเภทของเนื้องอกเป็นเกณฑ์ ($P=0.261$)

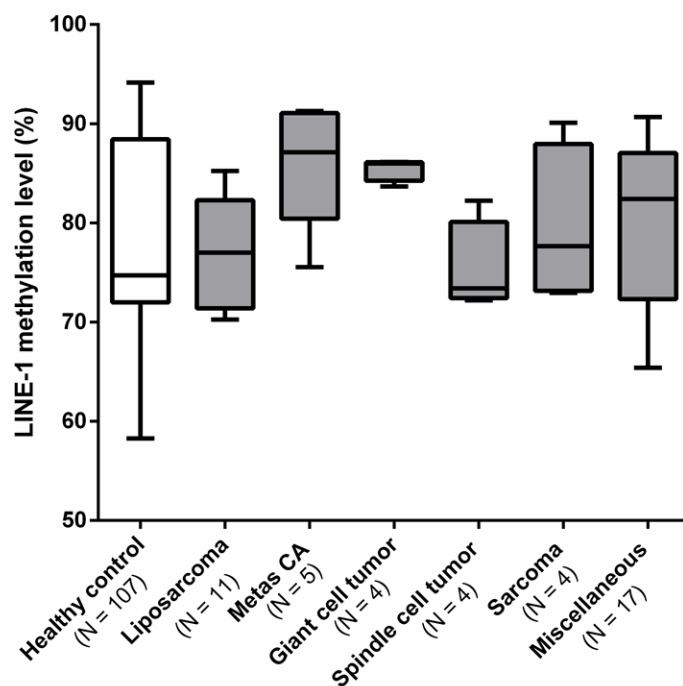
LINE-1 methylation in peripheral blood leukocytes



รูปที่ 27 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ในผู้ป่วยที่ทำการวิเคราะห์จาก peripheral blood leukocytes จำนวน 46 ราย ซึ่งวิเคราะห์โดยแบ่งตามประเภทของเนื้องอก ได้แก่ เนื้องอกbenign (N=24) และ malignant (N=22) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107)

เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes โดยจำแนกตามชนิดของโรค ได้แก่ liposarcoma (N=11) metas CA (N=5) giant cell tumor (N=4) spindle cell tumor (N=4) sarcoma (N=4) และอื่นๆ (N=17) พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ในทุกชนิดของโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107) ดังแสดงในรูปที่ 28

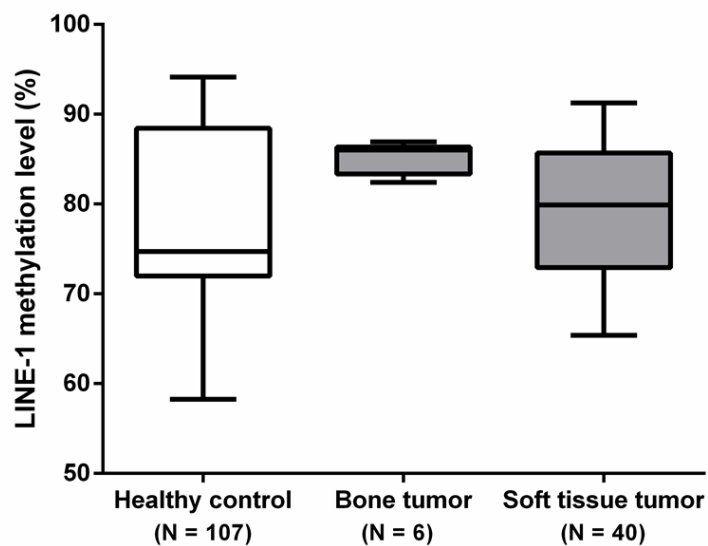
LINE-1 methylation in peripheral blood leukocytes



รูปที่ 28 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของโรคนี้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

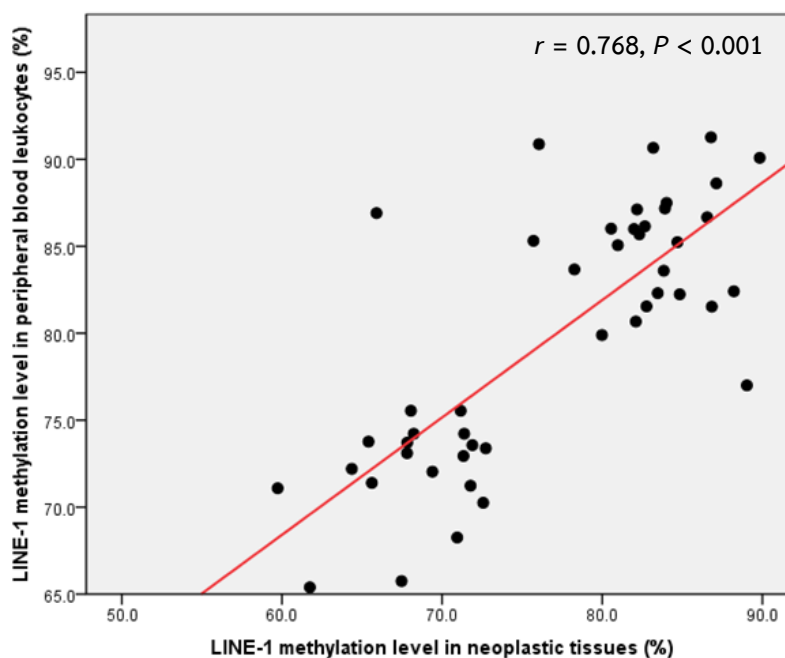
นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามชนิดของต้นกำเนิดของโรค ได้แก่ bone tumor (N=6) และ soft tissue tumor (N=40) พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ทั้งใน bone tumor และ soft tissue tumor ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107) ดังแสดงในรูปที่ 29

LINE-1 methylation in peripheral blood leukocytes



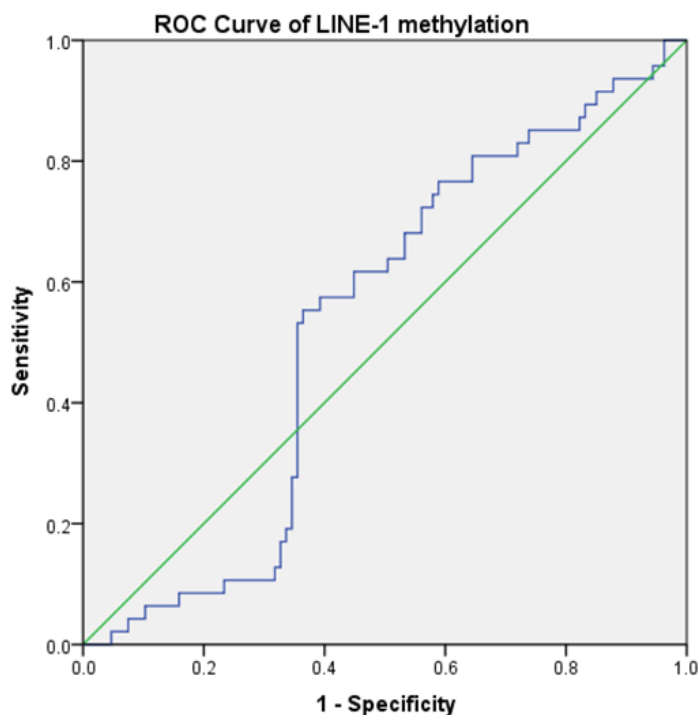
รูปที่ 29 ระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes จำแนกตามต้นกำเนิดของโรคนีื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ได้แก่ bone tumor (N=6) และ soft tissue tumor (N=40) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (N=107)

จากนั้นได้ศึกษาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เพื่อหาความสัมพันธ์ของสองตัวแปร ซึ่งวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Pearson's correlation ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับการเกิด LINE-1 methylation ระหว่าง neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

จากกราฟความสัมพันธ์ข้างต้น พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissue มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ peripheral blood leukocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.768, P<0.001$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation อาจสามารถตรวจวิเคราะห์ได้จาก peripheral blood leukocytes ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สะดวกและรวดเร็วและผู้ป่วยเจ็บปวดน้อย (non-invasive biomarker) เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์จาก neoplastic tissue นอกจากนี้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ใน Alu เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำและถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย จึงทำการวิเคราะห์ด้วยการสร้างกราฟ ROC curve ดังแสดงในรูปที่ 31 โดยพบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes มีความไวและความจำเพาะต่ำ (area under curve = 0.53, จุด cut off ที่ 76.37 และ $P=0.552$)



รูปที่ 31 กราฟ ROC curve แสดงถึงความไวและความจำเพาะของระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes

อย่างไรก็ตาม จากผลการวิเคราะห์ระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ที่ทำการวิเคราะห์ใน peripheral blood leukocytes จำนวน 46 รายและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 107 ราย ทางคณะผู้วิจัยจึงนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับการเกิดของ Alu และ LINE-1 methylation ดังกล่าวมาประเมินความเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดโรสดังกล่าวด้วยสถิติ regression analysis ดังแสดงในตารางที่ 13 จากผลการวิเคราะห์พบว่า overall Alu methylation มีความเกี่ยวข้องกันในเชิงบวก กล่าวคือมีโอกาสเสี่ยงที่อาจทำให้เป็นโรสดังกล่าว (OR: 1.13, 95%CI: 1.08-1.18 และ $P < 0.001$) สำหรับ overall LINE-1 methylation พบว่ามีความเสี่ยงที่อาจทำให้เป็นโรสดังกล่าวเช่นกันกับ Alu methylation แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (OR: 1.02, 95%CI: 0.98-1.06 และ $P = 0.423$) นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งระดับการเกิด methylation ตามค่ามัธยฐาน (median) ในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับการเกิด Alu methylation สูง (OR: 7.47, 95%CI: 3.27-17.06 และ $P < 0.001$) แต่ในระดับการเกิด LINE-1 methylation พบว่ามีระดับการเกิด methylation ต่ำ (OR: 2.03, 95%CI: 0.99-4.13 และ $P = 0.053$) และเพื่อประเมินค่าของผล dose response ระหว่างการเกิด Alu hypermethylation และ LINE-1 hypomethylation จึงทำการแบ่งเป็นค่า tertile โดยที่ระดับการเกิด Alu methylation ใน tertile ที่ 3 มีผลต่อความเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดโรค musculoskeletal

tumor ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ tertile ที่ 1 (OR: 14.17, 95%CI: 5.08-39.51 และ $P < 0.001$) ในส่วนของ LINE-1 methylation เมื่อทำการแบ่งเป็น tertile พบว่า tertile ที่ 2 มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งกล้ามเนื้อและกระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ tertile ที่ 1 (OR: 2.48, 95%CI: 1.04-5.93 และ $P = 0.041$)

ตารางที่ 13 ระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation ที่อาจทำให้เกิดความเสี่ยงในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

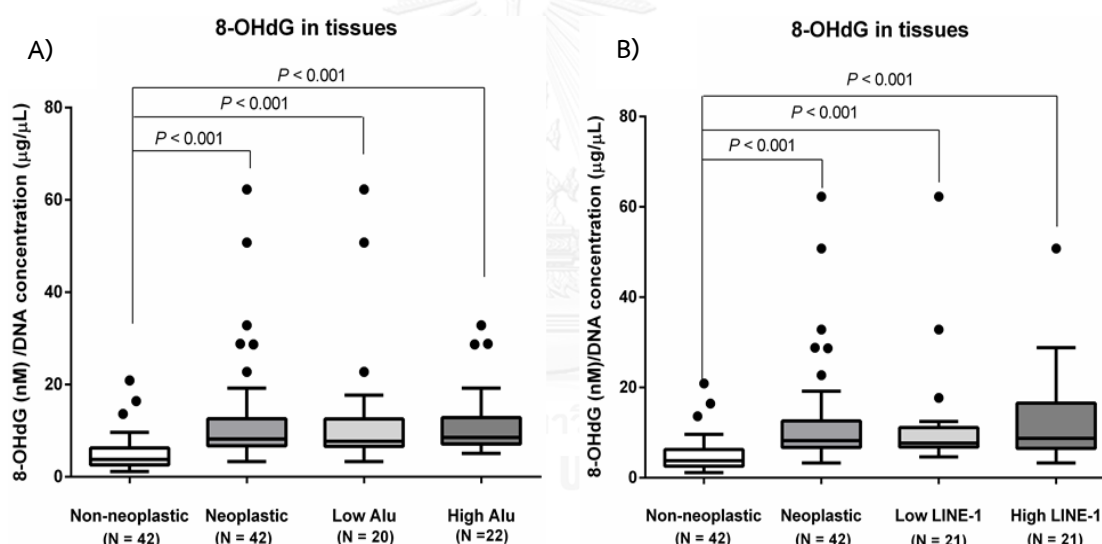
Repetitive elements	Patients (N = 46)	Healthy Controls (N = 107)	OR (95% CI)	P-value
Alu element				
Overall	100%	100%	1.13 (1.08-1.18)	< 0.001
By median				
Low methylation	19.1%	50%	1.00 (reference)	
High methylation	80.9%	50%	7.47 (3.27-17.06)	< 0.001
By tertile				
1st tertile	27.1%	33.33%	1.00 (reference)	
2nd tertile	25.8%	33.33%	1.17 (0.36-3.74)	0.796
3rd tertile	41.1%	33.33%	14.17 (5.08-39.51)	< 0.001
LINE-1 element				
Overall	100%	100%	1.02 (0.98-1.06)	0.423
By median				
Low methylation	51.4%	50%	2.03 (0.99-4.13)	0.053
High methylation	48.6%	50%	1.00 (reference)	
By tertile				
1st tertile	21.3%	33.33%	1.00 (reference)	
2nd tertile	63.8%	33.33%	2.48 (1.04-5.93)	0.041
3rd tertile	14.9%	33.33%	1.21 (0.48-3.04)	0.681

3. การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ด้วยเทคนิค ELISA

การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นทำการศึกษาในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor โดยตรวจวิเคราะห์ในสองส่วนหลัก ได้แก่ non-neoplastic และ neoplastic tissue จากผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 42 ราย และพลาสมาจากผู้ป่วย จำนวน 46 ราย รวมถึงกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 107 ราย

3.1 การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันใน non-neoplastic และ neoplastic tissue ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

จากการวิเคราะห์สภาวะความเครียดออกซิเดชันของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ใน non-neoplastic adjacent และ neoplastic tissue จำนวน 42 ราย และทำการแยกวิเคราะห์โดยแบ่งตามระดับการเกิด Alu methylation (low Alu และ high Alu) ดังแสดงในรูปที่ 32A พบว่าปริมาณ 8-OHdG ใน neoplastic tissue มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการเกิด Alu methylation พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ที่ต่ำและสูง (low และ high Alu) มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue อย่างไรก็ตาม ปริมาณ 8-OHdG ระหว่าง low และ high Alu ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

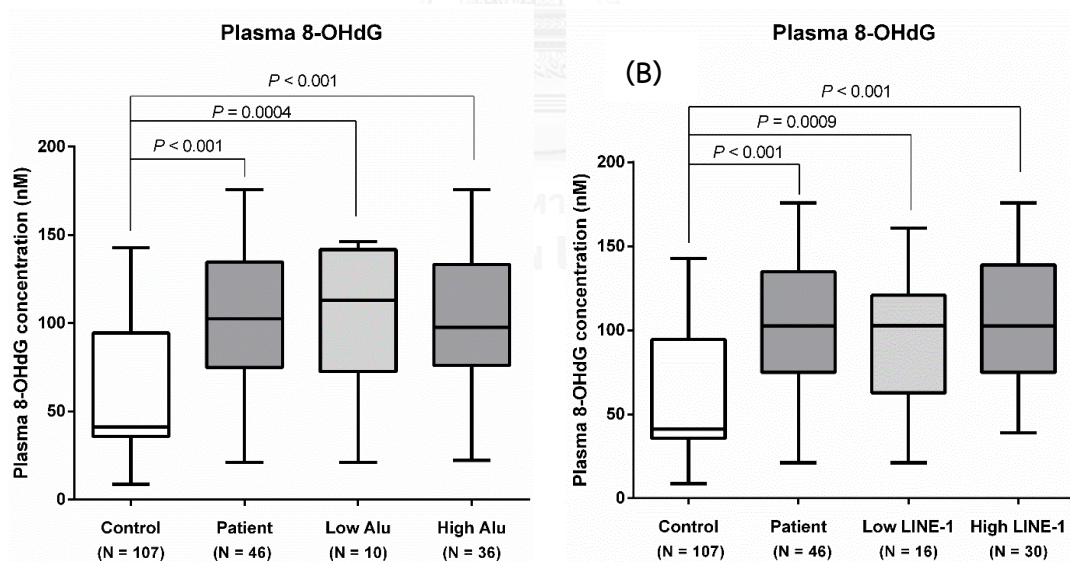


รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG ในชิ้นเนื้อ และ (A) ระดับการเกิด Alu methylation (B) ระดับการเกิด LINE-1 methylation ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาใน LINE-1 ของชิ้นเนื้อ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับระดับ 8-OHdG เช่นเดียวกับ Alu ดังแสดงในรูปที่ 32B จากการศึกษาพบว่า ระดับ 8-OHdG ใน neoplastic tissue มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue หลังจากนั้นจึงทำการแบ่งตามระดับการเกิด LINE-1 methylation (low และ high LINE-1) พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ทั้งใน low และ high LINE-1 มีระดับ 8-OHdG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues

3.2 การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันโดยตรวจวัดระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

นอกจากทำการศึกษาในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยแล้วนั้น ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ในพลาสมาของผู้ป่วยจำนวน 46 รายและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 107 ราย โดยทำการแยกวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 8-OHdG กับระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation เช่นเดียวกับใน tissue ดังแสดงในรูปที่ 33A และ 33B พบว่าระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ที่ต่ำและสูง (low และ high Alu) มีค่า 8-OHdG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$, $P < 0.001$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตาม ระดับ 8-OHdG ระหว่าง low และ high Alu ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อทำการแบ่งระดับการเกิด methylation เป็น low และ high LINE-1 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ 8-OHdG ทั้งใน low และ high LINE-1 มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.009$, $P < 0.001$ ตามลำดับ)



รูปที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ 8-OHdG ในพลาสมา และระดับการเกิด methylation ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor (A) ปริมาณ 8-OHdG ในพลาสมาที่มีการเกิดแบบ hypo- หรือ hypermethylation ของ Alu (B) ระดับ 8-OHdG ในพลาสมาที่มีการเกิดแบบ hypo- หรือ hypermethylation ของ LINE-1

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย การอภิปรายข้อมูล

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยจึงตรวจวัดระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor จำนวน 46 ราย ซึ่งวิเคราะห์ในส่วนของเนื้องอกที่เป็น neoplastic, non-neoplastic adjacent tissue และ peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจากผลการศึกษาเมื่อวิเคราะห์แยกด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า Alu สามารถแยกรูปแบบการเกิด methylation ได้แก่ $%^{m}C$, $%^{m}C^{u}C$, $%^{u}C^{m}C$ และ $%^{u}C^{u}C$ ทั้งหมด 5 ขนาดคู่เบส ได้แก่ 133, 90, 75, 58, และ 43 คู่เบส

เมื่อวิเคราะห์สถิติด้วย Wilcoxon matched-pairs signed rank test พบว่าใน neoplastic tissues ระดับการเกิด Alu methylation มีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ($P=0.59$) และเมื่อทำการแบ่งตามประเภทของเนื้องอกด้วยสถิติ One-way ANOVA ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเนื้องอกชนิด benign กับ malignant เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ($P=0.69$) นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีด้วยสถิติ Mann-Whitney test พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) และเมื่อทำการแบ่งตามความรุนแรงของเนื้องอกด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าระดับการเกิด Alu methylation มีค่าสูงกว่าทั้ง benign และ malignant อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ทั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic adjacent tissue กับ peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissues มีความสัมพันธ์กับ peripheral blood leukocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.779$, $P<0.001$) อีกทั้งเมื่อหาความไวและความจำเพาะของ peripheral blood leukocytes ในการวินิจฉัยโรคด้วยกราฟ ROC curve พบว่า Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes มีความไวและความจำเพาะสูง (area under curve = 0.825, จุด cut off ที่ 60.473 และ $P<0.001$) แสดงให้เห็นว่าอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยโรค musculoskeletal tumor ได้

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบการเกิด LINE-1 ซึ่งแยกวิเคราะห์ด้วย 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis สามารถแยกได้ 5 รูปแบบ ได้แก่ $%^{m}C$, $%^{m}C^{u}C$, $%^{u}C^{m}C$ และ $%^{u}C^{u}C$ ประกอบด้วยขนาด 92, 60, 50, 42 และ 32 คู่เบส ด้วยสถิติ

Wilcoxon matched-pairs signed rank test พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.032$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues แต่เมื่อทำการแบ่งเป็นเนื้องอกชนิด benign และ malignant เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.482$) นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ใน peripheral blood leukocytes เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่า ระดับการเกิด LINE-1 methylation นั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.796$) และเมื่อวิเคราะห์ระดับความรุนแรงของเนื้องอกซึ่งแบ่งเป็น benign และ malignant พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.261$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี หลังจากนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ใน neoplastic tissues มีความสัมพันธ์กับ peripheral blood leukocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.768$, $P<0.001$) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ถึงความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยโรคด้วยการพล ROC curve พบว่าความไวและความจำเพาะของ LINE-1 ใน peripheral blood leukocytes นั้นค่อนข้างต่ำ

ในส่วนของการศึกษาในภาวะเครียดออกซิเดชันแบ่งเป็นการศึกษา 2 ส่วน ส่วนแรกคือศึกษาวิเคราะห์จาก neoplastic tissues ของผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues พบว่าระดับ 8-OHdG ของผู้ป่วยมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับ 8-OHdG กับ Alu methylation ซึ่งทำการแบ่งค่า Alu methylation จากค่ามัธยฐานของระดับการเกิด Alu methylation ซึ่งแบ่งเป็น low และ high Alu ซึ่งจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ 8-OHdG ใน low และ high Alu มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง low และ high Alu และส่วนที่สองทำการศึกษาจากพลาสมาของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับของ 8-OHdG ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้เมื่อทำการแบ่งระดับเป็น low และ high Alu พบว่าระดับ 8-OHdG ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0004$, $P<0.001$ ตามลำดับ) แต่ในทางเดียวกันกับ Alu ระดับ 8-OHdG ใน low กับ high Alu ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ นอกจากการศึกษาใน Alu แล้ว ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาใน LINE-1 พบว่าใน neoplastic tissues มีระดับของ 8-OHdG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และเมื่อแบ่งตามระดับการเกิด LINE-1 methylation เป็น low และ high LINE-1 จากการวิเคราะห์ พบว่าใน low และ high LINE-1 มีระดับ 8-OHdG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) แต่ไม่พบความ

แตกต่างกันทางสถิติระหว่าง low และ high LINE-1 และเมื่อทำการวิเคราะห์ในส่วนของพลาสมา พบว่าระดับ 8-OHdG ในผู้ป่วยมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี สุดท้ายเมื่อทำการวิเคราะห์แบ่งระดับ low และ high LINE-1 พบว่าระดับของ 8-OHdG ในผู้ป่วยทั้ง low และ high มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0004$, $P < 0.001$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

อภิปรายผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับและรูปแบบการเกิด methylation ของ LINE-1 และ Alu ในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และ peripheral blood leukocytes จากผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการเกิด methylation ของ repetitive elements เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน เกิดความไม่เสถียรของจีโนมส่งผลทำให้เกิดโรคมะเร็งได้ในที่สุด(23) โดยกระบวนการเกิด methylation มีระดับการเกิด 2 ชนิดคือ hypomethylation และ hypermethylation ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการเกิด global methylation สามารถทำให้เกิดโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่ (24) เป็นต้น สมมติฐานหลักของงานวิจัยนี้ คือ ผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนจะมีระดับ methylation ลดลง (global hypomethylation) ใน neoplastic tissues เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ทั้งใน neoplastic tissues เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และใน peripheral blood leukocytes เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จากผลการศึกษาพบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue มีแนวโน้มสูงกว่า non-neoplastic tissue แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ อาจเพราะการตรวจวัดระดับการเกิด Alu methylation ในชิ้นเนื้อที่มีจำนวนผู้ป่วยน้อย อีกทั้งมีประเภทของโรคที่หลากหลาย ทำให้การวิเคราะห์ผลที่ได้นั้นยังไม่ชัดเจนเพียงพอ ซึ่งผลการศึกษาของ Alu ใน neoplastic และ non-neoplastic tissues นั้นไม่สอดคล้องกับสมมติฐานหลักที่ตั้งไว้ โดยการศึกษาที่ผ่านมาในโรคมะเร็งหลายชนิด พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในโรคมะเร็งมีการเกิดแบบ Alu hypomethylation ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งหลอดอาหาร พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งหลอดอาหารต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารที่เยื่อเมือกไม่เป็นมะเร็ง และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี แสดงให้เห็นว่าระดับการเกิด Alu methylation ที่ลดลงมีผลต่อการเจริญของโรคมะเร็งหลอดอาหาร (86) อีกทั้งมีการศึกษาในโรคมะเร็งปอด พบว่าการเกิด

Alu hypomethylation ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในระดับการเกิด Alu methylation ใน neoplastic tissue มีแนวโน้มสูงกว่า non-neoplastic adjacent tissue โดยการศึกษาที่สอดคล้องกับโรค post-traumatic stress disorder (PTSD) พบว่ามีการเกิด Alu hypermethylation ในผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (87) นอกจากนี้ศึกษาใน neoplastic และ non-neoplastic adjacent tissue แล้วทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าระดับ Alu methylation ที่สูงขึ้นใน peripheral blood เป็นเวลาติดต่อกันหลายปีก่อนได้รับการวินิจฉัย อาจมีความเกี่ยวข้องกับอัตราเสี่ยงที่ทำให้เกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก (88) และมีการศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มีระดับการเกิด Alu methylation สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (89) นอกจากนี้มีการศึกษาการเกิด Alu methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในโรคมะเร็งตับอ่อนให้ผลที่สอดคล้องกันคือการเกิด Alu methylation ในผู้ป่วยมีระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (68) ไม่เพียงแต่โรคมะเร็งหลายชนิดที่สามารถเกิดกระบวนการ Alu hypermethylation ได้แล้วนั้นยังมีการศึกษาในโรค multiple sclerosis ในเลือดของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าผู้ป่วยมีการเกิด Alu hypermethylation และมีความสัมพันธ์กับค่า EDSS score (90) เมื่อทางคณะผู้วิจัยวิเคราะห์ถึงระดับการเกิด Alu methylation ใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยวิเคราะห์ทางสถิติแบบ tertile ซึ่งเป็นภาวะวิเคราะห์แบบ dose-response effect พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน tertile ที่ 3 พบว่าระดับการเกิด Alu methylation ระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับการศึกษาในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งพบว่าระดับการเกิด Alu methylation ใน quartile ที่สูงที่สุดมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับ quartile ที่ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (89) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาในส่วนของ Alu elements ที่ทำให้เกิดกระบวนการ epigenetic โดยมีความเกี่ยวข้องกับ promoter และการถอดรหัสของยีน โดยพบว่า การเกิด active promoter ส่งผลให้เกิดกระบวนการ DNA demethylation ได้ แต่ในขณะเดียวกันการเกิด weak และ poised promoter ทำให้ระดับการเกิด methylation สูงขึ้น (87) แสดงให้เห็นว่าการเกิด Alu hypermethylation อาจเกิดจากการที่ promoter มีการทำงานลดลง ส่งผลให้มีระดับการเกิด methylation ที่สูงขึ้น

นอกจากศึกษาใน Alu element แล้วยังได้ทำการศึกษาใน LINE-1 element ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor ด้วยเช่นกัน จากผลการศึกษาสอดคล้องกับสมมติฐานข้อแรก พบว่าใน

neoplastic tissue มีระดับการเกิด LINE-1 methylation สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษานในโรคมะเร็งต่างๆ ยกตัวอย่างเช่นโรคมะเร็ง Head and Neck พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ที่มีการกระจายไปยังบริเวณ Head and Neck แต่ไม่พบเซลล์มะเร็ง (LN) และมะเร็ง Head and Neck ที่มีการกระจายของเซลล์มะเร็ง (LP) มีระดับต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็ง Head and Neck ที่ไม่มีการแพร่กระจาย (NM) (91) และสอดคล้องกับการศึกษานในโรคมะเร็งปอดระยะแรก ซึ่งผลการศึกษานพบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ในเนื้องอกมีระดับต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในการศึกษานดังกล่าวได้มีการศึกษานในระดับ promoter พบว่ามีการเกิด promoter hypermethylation ซึ่งการศึกษานดังกล่าวได้อภิปรายไว้ว่าการตรวจสอบโรคมะเร็งปอดอาจใช้การตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ควบคู่กับการตรวจวัด promoter hypermethylation (92) อีกทั้งมีการศึกษานในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่ามีการเกิด LINE-1 hypomethylation ซึ่งอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (93) นอกจากนี้มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาทั้งในโรคมะเร็งตับอ่อน และมะเร็งกระเพาะอาหาร (94) โดยให้ผลในทิศทางเดียวกันคือ ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งมีการเกิด LINE-1 hypomethylation เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ ซึ่งหลายการศึกษานแสดงให้เห็นว่าการเกิด LINE-1 hypomethylation ใน neoplastic tissue อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งได้ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาน LINE-1 methylation ใน peripheral blood leukocytes พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation มีแนวโน้มต่ำกว่าแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาน LINE-1 methylation ในโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (95) นอกจากนี้มีการศึกษานในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่ามีการเกิด LINE-1 hypomethylation ในผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (60) อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษานในมะเร็งกระเพาะอาหารซึ่งได้ผลที่เป็นในทิศทางเดียวกันคือเกิด LINE-1 hypomethylation ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (96), (97)ถึงแม้ว่าในการศึกษานครั้งนี้ระดับการเกิด LINE-1 methylation ที่ทำการศึกษานใน neoplastic tissue เปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ไม่พบใน peripheral blood leukocytes ก็ตาม แสดงให้เห็นว่าการเกิด DNA hypomethylation ใน peripheral blood leukocytes ของผู้ป่วยโรคมะเร็งอาจเกิดจาก tumor DNA ที่มีการไหลเวียนในกระแสเลือด กล่าวคือการเกิดและการรุกรานของเซลล์มะเร็งนั้นได้หลัง tumor DNA ออกมายังกระแสเลือด แต่การตรวจวัดระดับ DNA methylation พบในมะเร็งระยะแรกๆ โดยที่ tumor DNA

สามารถวัดได้ในพลาสมาแต่ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดระดับการเกิด DNA methylation ใน peripheral blood leukocytes (98)

เมื่อวิเคราะห์ระดับการเกิด Alu และ LINE-1 methylation กับลักษณะข้อมูลทางคลินิก แล้วนั้น พบว่าไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chalitchagorn และคณะ (9) รายงานว่าระดับการเกิด LINE-1 methylation ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค COBRA กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hsiung et al (99) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างระดับการเกิด LINE-1 methylation กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกเมื่อทำการ adjust ปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อระดับการเกิด LINE-1 methylation ได้แก่ อายุ สัญชาติ การสูบบุหรี่ แล้วก็ตาม สอดคล้องกับใน Alu methylation ซึ่งเป็นการศึกษาของ Zhu et al. (99) พบว่าระดับการเกิด Alu methylation กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตามบางการศึกษาพบว่า ระหว่างระดับการเกิด methylation ของ repetitive elements กับลักษณะข้อมูลทางคลินิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายและหญิง (100), (101)

เมื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ใน neoplastic tissue กับ peripheral blood leukocytes พบว่าระดับการเกิดทั้งใน LINE-1 และ Alu methylation ใน tissue มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ peripheral blood leukocytes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานข้อที่สอง จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็น peripheral blood leukocytes ในผู้ป่วยอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ไม่รุนแรงแทนการตรวจจาก neoplastic tissue ได้

สุดท้ายทางคณะผู้วิจัยทำการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน ในผู้ป่วยโรค musculoskeletal tumor พบว่าระดับ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับระดับ 8-OHdG ใน neoplastic tissues พบว่ามีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissues และเมื่อวิเคราะห์ระดับ 8-OHdG โดยแบ่งเป็นการวิเคราะห์ควบคู่กับระดับ LINE-1 และ Alu methylation ในผู้ป่วย พบว่าระดับ low และ high ของทั้ง LINE-1 และ Alu มีระดับ 8-OHdG สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Udomsinprasert และคณะ รายงานว่าระดับของ 8-OHdG ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (10) นอกจากนี้รายงานการศึกษาในโรคมะเร็งตับ พบว่า 8-OHdG สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะของโครมาตินจาก active chromatin เป็น repressive chromatin ส่งผลให้เกิดกระบวนการ methylation ที่เปลี่ยนแปลงไปนำไปสู่โรคมะเร็งตับในที่สุด (102) สอดคล้องกับการศึกษาใน

โรคมะเร็งอีกหลายชนิด ได้แก่โรคมะเร็งไต (103) มะเร็งเต้านม (78) มะเร็งกระเพาะอาหาร (81) พบว่าระดับ 8-OHdG ใน neoplastic tissue มีปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ non-neoplastic adjacent tissue หรือ normal tissue โดยทางคณะผู้วิจัยคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไกที่ 8-OHdG ไม่สามารถซ่อมแซมเบสที่ผิดปกติไปได้ กล่าวคือระดับ 8-OHdG ที่สูงขึ้นทำให้เกิดโรคมะเร็งผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงเบส ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ 8-OHdG ที่เสียหายเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ mutation transversion (104) หรืออาจเกิดจากกลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระในร่างกาย มี antioxidant อย่าง glutathione ไม่เพียงพอในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ โดยปกติ glutathione สร้างมาจากกรดอะมิโน homocysteine เมื่อเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชันทำให้ homocysteine ไม่เพียงพอต่อการสร้าง glutathione เซลล์จึงมีการสลาย S-adenosyl Methionine (SAM) เพื่อนำมาสร้างเป็น homocysteine ทำให้ SAM มีลดลง ทำให้ขาด SAM ที่นำไปใช้ในกระบวนการ DNA methylation (105)

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้ทำการศึกษาในโรค musculoskeletal tumor ซึ่งมีความหลากหลายของประเภทโรครวมถึงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละโรคค่อนข้างน้อย ส่งผลให้การตรวจสอบในแต่ละประเภทของโรคอาจใช้ขนาดของประชากรให้มากขึ้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาระดับการเกิด LINE-1 และ Alu methylation ทั้งในชิ้นเนื้อเนื้องอก (neoplastic tissue) และชิ้นเนื้อปกติข้างเคียง (non-neoplastic tissue) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes) ให้ชัดเจนขึ้น อีกทั้งการวิเคราะห์ระดับการเกิด methylation ของผู้ป่วย อาจสามารถตรวจวัดในระดับ promoter ในตำแหน่ง CpG ต่างๆ ผลที่ได้ อาจสามารถนำมาประกอบกับการตรวจวัดระดับ LINE-1 และ Alu methylation ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ได้เพื่อก่อให้เกิดความรู้ ความเข้าใจกลไกของการเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเหนือพันธุกรรมและอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้พยากรณ์โรค musculoskeletal tumor อย่างไรก็ตามการศึกษามีการเก็บข้อมูลลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยแต่ละรายไม่ครบถ้วนส่งผลให้การวิเคราะห์ลักษณะข้อมูลทางคลินิกชนิดอื่นไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ดังนั้นการศึกษานในอนาคต โรคดังกล่าวอาจต้องมีการเก็บข้อมูลลักษณะทางคลินิกให้ครบถ้วนมากขึ้น เพื่อจะได้ทราบถึงปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อการเกิดโรค musculoskeletal tumor ได้ต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Ofluoglu O, Boriani S, Gasbarrini A, De Iure F, Donthineni R. Diagnosis and planning in the management of musculoskeletal tumors: surgical perspective. *Semin Intervent Radiol.* 2010;27:185-90.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.
3. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5--a population-based study. *The Lancet Oncol.* 2014;15:35-47.
4. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54:8-29.
5. Chen S, Yang L, Pu F, Lin H, Wang B, Liu J, et al. High Birth Weight Increases the Risk for Bone Tumor: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12:11178-95.
6. W. Imsamran AC, S. Wiangnon DP, K. Suwanrungrung, S. Sangrajrang RB. Cancer in Thailand 2012. 34-60 p.
7. Gatta G, Zigon G, Capocaccia R, Coebergh JW, Desandes E, Kaatsch P, et al. Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer.* 2009;45:992-1005.
8. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457-63.
9. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene.* 2004;23:8841-6.

10. Udomsinprasert W, Kitkumthorn N, Mutirangura A, Chongsisawat V, Poovorawan Y, Honsawek S. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Sci Rep*. 2016;6:26969.
11. Chial H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 2008;1:33.
12. Perkins GL SE, Sanders GK, Prichard JG. Serum tumor markers. *Am Fam Physician*. 2003;68:624-30.
13. al. BHHYe. Sensitivity, specificity and prognostic value of CEA in colorectal cancer: results of a Tunisian series and literature review. *Tunis Med*. 2001;79:434-40.
14. Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat genet*. 1998;19:19-24.
15. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
16. Brouha B, Meischl C, Ostertag E, de Boer M, Zhang Y, Neijens H, et al. Evidence consistent with human L1 retrotransposition in maternal meiosis I. *Am J Hum genet*. 2002;71:327-36.
17. Van den Hurk JA, Meij IC, Seleme MC, Kano H, Nikopoulos K, Hoefsloot LH, et al. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol genet*. 2007;16:1587-92.
18. Kaer K, Speek M. Retroelements in human disease. *Gene*. 2013;518:231-41.
19. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Ferec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum genet*. 2005;117:411-27.
20. Sigurdsson MI, Smith AV, Bjornsson HT, Jonsson JJ. The distribution of a germline methylation marker suggests a regional mechanism of LINE-1 silencing by the piRNA-PIWI system. *BMC genet*. 2012;13:31.
21. Ashktorab H, Darempouran M, Goel A, Varma S, Leavitt R, Sun X, et al. DNA methylome profiling identifies novel methylated genes in African American patients with colorectal neoplasia. *Epigenetics*. 2014;9:503-12.
22. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Qi X, Jiang X, Shi-Jie M. LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. *Genet Med*. 2016;18:431-9.

23. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet.* 2001;35:501-38.
24. Mighell AJ, Markham AF, Robinson PA. Alu sequences. *FEBS Lett.* 1997;417:1-5.
25. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol.* 2007;211:269-77.
26. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:6823-36.
27. Choi IS, Estecio MR, Nagano Y, Kim DH, White JA, Yao JC, et al. Hypomethylation of LINE-1 and Alu in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors). *Mod Pathol.* 2007;20:802-10.
28. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.
29. musculoskeletal tumors [Internet]. 2016.
30. Gustafson P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1994;259:1-31.
31. Rydholm A BN, Gullberg B, Thorngren KG, Persson BM. Epidemiology of soft-tissue sarcoma in the locomotor system. A retrospective population-based study of the inter-relationships between clinical and morphologic variables. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.* 1984;92:363-74.
32. Kirkpatrick CJ, Alves A, Kohler H, Kriegsmann J, Bittinger F, Otto M, et al. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. *Am J Pathol.* 2000;156:1455-67.
33. Mertens F, Stromberg U, Mandahl N, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, et al. Prognostically important chromosomal aberrations in soft tissue sarcomas: a report of the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Study Group. *Cancer Res.* 2002;62:3980-4.

34. Hamm CA, Xie H, Costa FF, Vanin EF, Seftor EA, Sredni ST, et al. Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PloS one*. 2009;4:e8340.
35. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115:1531-43.
36. Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, et al. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol*. 2006;19:106-14.
37. Yoo J, Robinson RA, Lee JY. H-ras and K-ras gene mutations in primary human soft tissue sarcoma: concomitant mutations of the ras genes. *Mod Pathol*. 1999;12:775-80.
38. Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Takahira T, Yamamoto H, Tamiya S, et al. Genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in soft tissue sarcomas. *Hum Pathol*. 2005;36:357-63.
39. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis*. 2010;16:286-91.
40. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, Ronchetti D, Mosca L, Deliliers GL, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis*. 2009;30:1330-5.
41. Pal A, Srivastava T, Sharma MK, Mehndiratta M, Das P, Sinha S, et al. Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2010;14:2646-54.
42. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int Colorectal Dis*. 2004;19:95-101.
43. Sirivanichsuntorn P, Keelawat S, Danuthai K, Mutirangura A, Subbalekha K, Kitkumthorn N. LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma. *BMC Clin Pathol*. 2013;13:10.
44. Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, 3rd, et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science*. 2012;337:967-71.

45. Anwar SL, Krech T, Hasemeier B, Schipper E, Schweitzer N, Vogel A, et al. Loss of DNA methylation at imprinted loci is a frequent event in hepatocellular carcinoma and identifies patients with shortened survival. *Clin Epigenetics*. 2015;7:110.
46. Scott EC, Devine SE. The Role of Somatic L1 Retrotransposition in Human Cancers. *Viruses*. 2017;9.
47. Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene*. 1997;189:227-34.
48. Wanichnopparat W, Suwanwongse K, Pin-On P, Aporntewan C, Mutirangura A. Genes associated with the cis-regulatory functions of intragenic LINE-1 elements. *BMC genomics*. 2013;14:205.
49. Shuangshoti S, Hourpai N, Pumsuk U, Mutirangura A. Line-1 hypomethylation in multistage carcinogenesis of the uterine cervix. *Asian Pac J Cancer Prev : APJCP*. 2007;8:307-9.
50. Goodier JL. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA*. 2016;7:16.
51. Scott EC, Gardner EJ, Masood A, Chuang NT, Vertino PM, Devine SE. A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer. *Genome Res*. 2016;26:745-55.
52. Helman E, Lawrence MS, Stewart C, Sougnez C, Getz G, Meyerson M. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. *Genome Res*. 2014;24:1053-63.
53. Paterson AL, Weaver JM, Eldridge MD, Tavaré S, Fitzgerald RC, Edwards PA, et al. Mobile element insertions are frequent in oesophageal adenocarcinomas and can mislead paired-end sequencing analysis. *BMC genomics*. 2015;16:473.
54. Rodic N, Steranka JP, Makohon-Moore A, Moyer A, Shen P, Sharma R, et al. Retrotransposon insertions in the clonal evolution of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Med*. 2015;21:1060-4.
55. Tubio JM, Li Y, Ju YS, Martincorena I, Cooke SL, Tojo M, et al. Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science*. 2014;345:1251343.

56. Shukla R, Upton KR, Munoz-Lopez M, Gerhardt DJ, Fisher ME, Nguyen T, et al. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell*. 2013;153:101-11.
57. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*. 1992;70:5-8.
58. Keelawat S, Thorner PS, Shuangshoti S, Bychkov A, Kitkumthorn N, Rattanatanyong P, et al. Detection of global hypermethylation in well-differentiated thyroid neoplasms by immunohistochemical (5-methylcytidine) analysis. *J Endocrinol Invest*. 2015;38:725-32.
59. Ogino S, Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, et al. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2008;122:2767-73.
60. Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, Plaza S, Gagne L, Zens MS, et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin cancer Res : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16:1682-9.
61. Salas LA VC, Tajuddin SM, Amaral AF, Fernandez AF, Moore LE et al. LINE-1 methylation in granulocyte DNA and trihalomethane exposure is associated with bladder cancer risk. *Epigenetics*. 2014:1532-9.
62. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res*. 1992;52:643-5.
63. Belancio VP, Deininger PL, Roy-Engel AM. LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease. *Genome Med*. 2009;1:97.
64. Xie H, Wang M, Bonaldo Mde F, Smith C, Rajaram V, Goldman S, et al. High-throughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:4331-40.
65. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*. 2002;3:370-9.
66. Polak P DE. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC genomics*. 2006;7:133.

67. Chen J, Huan W, Zuo H, Zhao L, Huang C, Liu X, et al. Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma. *Oncotarget*. 2016;7:26099-106.
68. Neale RE, Clark PJ, Fawcett J, Fritschi L, Nagler BN, Risch HA, et al. Association between hypermethylation of DNA repetitive elements in white blood cell DNA and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol*. 2014;38:576-82.
69. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 10:5-12.
70. Shen HM SC, Shen Y, Ong CN. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B-1. *Free Rad Biol Med* 1996:139-46.
71. Halliwell B GJ, Cross CE. Free-radicals, antioxidants, and human-disease – Where are we now. *J Lab Clin Med*. 1992:598–620.
72. Ward JF LC, Calabro-Jones P, Evans JW et al. Radiation versus chemical damage to DNA. *Anticarcinogenesis and Radiation Protection*. 1988:321-7.
73. Bartsch H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res*. 1996;340:67-79.
74. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*. 2011;711:193-201.
75. Bohr VA TB, Larminat F. DNA repair, oxidative stress and aging. *Oxidative Stress and Aging*. 1995:101-10.
76. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med*. 2002;33:875-85.
77. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett*. 2000;151:87-95.
78. Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 1996;32A:1209-14.

79. Romano G, Sgambato A, Mancini R, Capelli G, Giovagnoli MR, Flamini G, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis*. 2000;21:1143-7.
80. S. Kondo ST, Y. Iwasa, T. Tanaka, H. Onodera, H. Hiai, M. Imamura. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. *Free Radic Biol Med*. 1999;40:1-10.
81. Lee BM, Jang JJ, Kim HS. Benzo[a]pyrene diol-epoxide-I-DNA and oxidative DNA adducts associated with gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett*. 1998;125:61-8.
82. Schwarz KB, Kew M, Klein A, Abrams RA, Sitzmann J, Jones L, et al. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2001;46:2173-8.
83. Vulimiri SV, Wu X, Baer-Dubowska W, Andrade M, Detry M, Spitz MR, et al. Analysis of aromatic DNA adducts and 7,8-dihydro-8-oxo-2' deoxyguanosine in lymphocyte DNA from a case-control study of lung cancer involving minority populations. *Mol Carcinog*. 2000;27:330.
84. A.C.E. Campos FM, F.H.M. Melo, L.C. Galdier, C.R.W. Carneiro, V. D'Almeida et al. Oxidative stress modulate DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia*. 2007:1111-21.
85. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2008;266:6-11.
86. Matsuda Y, Yamashita S, Lee YC, Niwa T, Yoshida T, Gyobu K, et al. Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization. *Cancer Causes Control : CCC*. 2012;23:865-73.
87. Mallona I, Jorda M, Peinado MA. A knowledgebase of the human Alu repetitive elements. *J Biomed Inform*. 2016;60:77-83.
88. Barry KH, Moore LE, Liao LM, Huang WY, Andreotti G, Poulin M, et al. Prospective study of DNA methylation at LINE-1 and Alu in peripheral blood and the risk of prostate cancer. *Prostate*. 2015;75:1718-25.

89. Walters RJ, Williamson EJ, English DR, Young JP, Rosty C, Clendenning M, et al. Association between hypermethylation of DNA repetitive elements in white blood cell DNA and early-onset colorectal cancer. *Epigenetics*. 2013;8:748-55.
90. Neven KY, Piola M, Angelici L, Cortini F, Fenoglio C, Galimberti D, et al. Repetitive element hypermethylation in multiple sclerosis patients. *BMC genetics*. 2016;17:84.
91. Kitkumthorn N, Keelawat S, Rattanatanyong P, Mutirangura A. LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:4469-75.
92. Rhee YY, Lee TH, Song YS, Wen X, Kim H, Jheon S, et al. Prognostic significance of promoter CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in stage I lung adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2015;466:675-83.
93. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Nat Cancer Inst*. 2008;100:1734-8.
94. Yamamura K, Kosumi K, Baba Y, Harada K, Gao F, Zhang X, et al. LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. *Surg today*. 2017.
95. Dauksa A GA, Endzinas Z, Oldenburg J, El-Maarri O. DNA methylation at selected CpG sites in peripheral blood leukocytes is predictive of gastric cancer. *Anticancer Res*. 2014;34:5381-8.
96. Hou L WH, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, et al. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high risk Polish population. *Int J Cancer*. 2010;127:1866–74.
97. Gao Y BA, Shu X, Ji B, Yu K, et al. . Blood leukocyte Alu and LINE-1 methylation and gastric cancer risk in the Shanghai Women’s Health Study. *Br J Cancer* 2012;106:585-91.
98. Woo HD KJ. Global DNA Hypomethylation in Peripheral Blood Leukocytes as a Biomarker for Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PloS one*. 2012;7:e34615. doi:10.1371/journal.pone.0034615.

99. Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, et al. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol.* 2012;41:126-39.
100. Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonefeld-Jorgensen EC. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect.* 2008;116:1547-52.
101. Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet.* 2004;68:196-204.
102. Nishida N, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, et al. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 2013;31:459-66.
103. Okamoto K TS, Uchida K, Ogawa O, Takenewa J, Takehi Y et al. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1994;58:825-29.
104. Unfried K SC, Abel J. Distinct spectrum of mutations induced by crocidolite asbestos: clue for 8-hydroxydeoxyguanosine dependent mutagenesis in vivo. *Cancer Res.* 2002;62:99-104.
105. A.C.E. Campos FM, F.H.M. Melo, L.C. Galdier, C.R.W. Carneiro, V. D'Almeida et al. Oxidative stress modulate DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007;9:1111-21.



ภาคผนวก


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูล และหนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

1. เอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (Information sheet for patients)
2. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form)



	คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย	เอกสารแจ้งข้อมูลคำอธิบายสำหรับ	AF 09-04/5.0
	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย	หน้า 0/7

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาโกลบอลเมทิลเลชันในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน
ผู้สนับสนุนการวิจัย ไม่มี

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ ฒมลวรรณ วรฤทัย
 ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2564718
 เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 081-6231174

ผู้วิจัยร่วม (ทุกท่าน)

1. ชื่อ ศ.นพ.สิทธิศักดิ์ หารธาเวก
 ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 4482-256-02
 เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 0425466-085

2. ชื่อ นพ.กฤษณ์ เจริญลาภ
 ที่อยู่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 2564510-02
 เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 081-5638370

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยที่เข้ามารับการผ่าตัดรักษาอาการของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคนี้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนถือได้ว่าเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์เกิดที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้องอกชนิดอื่น แต่พบว่ามีความหลากหลายของโรคค่อนข้างสูง และมีความรุนแรงมาก โดยที่เนื้องอกกระดูกมีอุบัติการณ์เกิดคิดเป็นร้อยละ 0.5 ของเนื้องอกทั้งหมด โดยพบมากในวัยเด็กและวัยรุ่นมากกว่าวัยผู้ใหญ่ ในส่วนของเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดที่สูงกว่าประมาณ 3-4 เท่า และอาการของโรคนี้อาจจะแสดงออกในช่วงหลังจากอายุ 50 ปี อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานถึงโรคมะเร็งกระดูก มีอุบัติการณ์การเกิดร้อยละ 0.2 ของมะเร็งทั้งหมด ซึ่งมีความรุนแรงเป็นอันดับที่ 4 ทำให้ผู้ป่วยที่อายุต่ำกว่า 20 ปี เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งดังกล่าว จากการสำรวจและงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งกระดูกที่ผ่านมามีแสดงให้เห็นว่า ในระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาในประเทศแถบยุโรป พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ประมาณร้อยละ 61.8 และในประเทศสหรัฐอเมริกาอัตราการรอดชีวิตที่ประมาณร้อยละ 79 ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับสมาคมมะเร็งแห่งประเทศไทย (American Cancer Society) ในปี พ.ศ. 2558 ที่คาดการณ์ว่า สถิติการเกิดมะเร็งกระดูก มีจำนวน 2,970 ราย และมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งกระดูกและข้อจำนวน 1,490 ราย ในส่วนของมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนมีอุบัติการณ์เกิดร้อยละ 1 ของเนื้องอกทั้งหมด ซึ่งในปี พ.ศ. 2547 ได้มีการรายงานว่า ประเทศสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วยโรคเนื้องอกเนื้อเยื่ออ่อน ประมาณ 8,680 ราย และมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งดังกล่าวสูงถึง 3,660 ราย ในส่วนของรายงานในประเทศไทยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2555 คาดการณ์ว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งกระดูกจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนจำนวน 41 ราย

อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยในโรคนี้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากโรคนี้อาจจะแสดงอาการก็ต่อเมื่อมีความรุนแรงมากขึ้น จึงต้องอาศัยการตรวจชิ้นเนื้อและดูลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีหลัก แต่ในการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดต่างๆ ในด้านการแยกเนื้องอกที่ไม่อันตรายออกจากเนื้องอกที่เป็นอันตราย โดยโรคนี้ออกกระดูกที่ไม่อันตราย อาจจะทำการรักษาโดยการผ่าตัดและเฝ้าระวังการเกิดซ้ำ ส่วนเนื้องอกที่เป็นอันตราย ผู้ป่วยอาจจะทำการรักษาโดยใช้เคมีบำบัด การฉายรังสีรักษาร่วมกับการผ่าตัด โดยที่ผู้ป่วยจำนวนมากได้รับการวินิจฉัยช้าก่อนที่จะได้รับการรักษา จึงจำเป็นต้องพัฒนาค้นหาวิธีตรวจและตัวบ่งชี้ (biomarkers) โรคมะเร็งในผู้ป่วยให้มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับและรูปแบบการเกิดเมทิลเลชัน (methylation) ของไลน์-1 (LINE-1) และอลู (Alu) ในเนื้องอก เนื้อเยื่อปกติข้างเคียง และเม็ดเลือดขาวจากเลือด (peripheral blood leukocyte) จากผู้ป่วยโรคนี้ออกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน โดยอาศัยเทคนิควิเคราะห์แบบควิบรา (quantitative combine bisulfite restriction analysis; qCOBRA) และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชัน (methylation) และรูปแบบของไลน์-1 (LINE-1) และอลู (Alu) ในเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน เปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวจากเลือด (peripheral blood leukocyte) ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค โดยทำการ

รวบรวมชิ้นเนื้อที่เป็นเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนและชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง และทำการเจาะเลือดจากผู้ป่วยโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการ 37 คน การวิจัยนี้ใช้ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดตามแผนการรักษา ไม่ต้องตัดชิ้นเนื้อเพิ่มแต่อย่างใด

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอทำการเก็บชิ้นเนื้อที่เป็นเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน รวมถึงชิ้นเนื้อปกติบริเวณข้างเคียง ขนาด 0.2 x 0.2 เซนติเมตร ขณะที่ท่านเข้ารับการรักษา ในวันที่ท่านได้รับการนัดหมายให้มารับการผ่าตัดโดยแพทย์ผู้ให้การรักษา ซึ่งชิ้นเนื้อดังกล่าวต้องได้รับการผ่าตัดออกตามแผนการรักษาของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยอยู่แล้ว แม้ไม่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ร่วมกับการเจาะเก็บเลือดปริมาตร 7 มิลลิลิตร (1 ซ้อนชาครึ่ง) ก่อนการผ่าตัด โดยทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ -80 °C ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาชีวเคมี อาคารแพทยพัฒน์ ชั้น 7 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำไปศึกษาระดับการเกิดเมทิลเลชันของลำดับเบสในจีโนม ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคเนื้องอกของกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน และหาตัวบ่งชี้ถึงการเกิดมะเร็งในผู้ป่วย (biomarkers) และใช้ติดตามผลการรักษาจากตัวอย่างเลือด

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยเป็นระยะเวลา 1 ปี ให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้ทำการติดตามผลหลังจากที่ท่านเข้ารับการรักษาแล้ว

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ท่านอาจจะได้รับความเสี่ยงและความไม่สะดวกสบายจากการเก็บชิ้นเนื้อเล็กน้อย เนื่องจากการเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวจะเก็บเมื่อท่านเข้ารับการรักษาตามแผนการรักษาตามปกติของทีมแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยเท่านั้น กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการดังกล่าวข้างต้น หรืออาการอื่น ๆ ที่พบร่วมด้วย ระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด หรือหน้ามืด และโอกาที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ในการเก็บชิ้นเนื้อ ท่านจะไม่ได้รับความเสี่ยงเพิ่มขึ้นจากปกติ ถ้าท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านั้นเป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ จากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นความรู้พื้นฐานในการอธิบายสาเหตุและการดำเนินไปของโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนในอนาคต การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการเข้าร่วมการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน อีกทั้งจะได้รับการชดเชยการสูญเสียเวลา เสียรายได้ตามความเหมาะสม

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นางสาวธมลวรรณ วรฤทัย โทรศัพท์ 081-6231174 และแพทย์ผู้ร่วมวิจัยคือ ศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 5466-042-085 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ จากการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งหมด สำหรับค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวกับการรักษาและการผ่าตัด เช่น ค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ท่านจะเป็นผู้รับผิดชอบเองตามปกติ

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

-ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ผู้ตรวจสอบการวิจัย และหน่วยงานควบคุมระเบียบกฎหมาย สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทาง

การแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม โดยไม่ละเมิดสิทธิของท่านในการรักษาความลับ
เกินขอบเขตที่กฎหมายและระเบียบกฎหมายอนุญาตไว้

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วม
โครงการวิจัยนี้ของท่านให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

การยกเลิกการให้ความยินยอม

หากท่านต้องการยกเลิกการให้ความยินยอมดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งผู้ทำวิจัยคือ นางสาวธมล
วรรณ วรฤทัย โทรศัพท์ 081-6231174 และแพทย์ผู้ร่วมวิจัยคือ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก โทรศัพท์
02-256-4482, 5466-042-085หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873

ถ.พระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของ
ท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และ
ท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการ
วิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

การจัดการกับตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากท่านซึ่งเป็นชิ้นเนื้อที่ต้องได้รับการผ่าตัดตามแผนการรักษาปกติ แม้ไม่เข้า
ร่วมในโครงการวิจัยนี้ หลังเสร็จสิ้นการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บไว้ใช้ในอนาคต โดยจะขออนุญาตเก็บตัวอย่าง
ชิ้นเนื้อที่เหลือไว้ในรูปปรีนาม โดยใช้รหัสที่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลเดิมของท่านได้ แต่จะเก็บรักษาข้อมูล
ของท่านไว้เป็นความลับ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะและไม่มีการบันทึกข้อมูลส่วนตัวของท่านเพิ่มเติม เพื่อ
ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้า โดยจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80° C เป็นระยะเวลา 2 0
ปี ในกรณีที่ครบกำหนดระยะเวลาจัดเก็บผู้ทำวิจัยจะขอเก็บชิ้นเนื้อที่เหลือต่อไว้ในอนาคต โดยจะทำ
บันทึกขออนุญาตผ่านหัวหน้าภาควิชามายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ทั้งนี้การศึกษาวิจัย
ในภายภาคหน้าทุกครั้งที่มีการใช้ชิ้นเนื้อที่เก็บไว้จะ ต้องแจ้งขออนุญาตและได้รับการอนุมัติจาก
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยทุกครั้ง โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บไว้จะไม่มีการจำหน่ายหรือ
นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ ส่วนตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการวิจัยจะถูกทำลายทั้งหมดตามขั้นตอนมาตรฐานของ
การกำจัดตัวอย่างทางชีวภาพ

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้


2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพล บังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์/โทรสาร 0-2256-4493 ในเวลาราชการ หรือ e-mail : medchulairb@chula.ac.th

การลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ขอขอบคุณในการให้ความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

	คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วม โครงการสำหรับอาสาสมัคร	AF 09-05/5.0
			หน้า 1/2

การวิจัยเรื่อง การศึกษาโกลบอลเมทีเลชันในผู้ป่วยโรคเนื้องอกกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....ได้อ่านรายละเอียดจาก
เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วม
โครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ
วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัย
นี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย
อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางการรักษา
โดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว
โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการ
รักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และ
การบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการ
ยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจ
และประมวลผลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล
เท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติ
ทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วม
โครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัว
ข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถ
ยกเลิกการใช้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ
จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การ

ตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....)ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

- ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ
 มีแต่ไม่มีการขอเก็บ
 มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ยินยอม
 ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....)ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....)ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....)ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ข
การเตรียมบัฟเฟอร์ และสารละลาย

1. สารละลาย 10X Tris-boric EDTA buffer (10X TBE buffer)

Tris base	121.1	g
Boric acid anhydrous	55.6	ml
0.5 M Na ₂ EDTA	40	ml
Distilled water	1,000	ml

หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำสารละลายปรับ pH เท่ากับ 8.3

2. 6X loading dye

Bromophenol blue	0.25	g
Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1 M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water	100	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. สารละลาย 10% Ammonium persulfate มหาวิทยาลัย

Ammonium persulfate	0.1	g
Distilled water	1	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4. สารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	g
Na ₂ HPO ₄	1.16	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCl	0.2	g
Distilled water	1,000	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วทำการปรับ pH เป็น 7.2 หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย) นางสาวธมลวรรณ วรฤทัย

(ภาษาอังกฤษ) Miss Thamonwan Woraruthai

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 68/105 ลุมพินี วิลล์ อ่อนนุช-ลาดกระบัง ถนนลาดกระบัง
แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์ 081-6231174

การศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(พ.ศ. 2554-2558)

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2558-2560)

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง ระดับอนุเมทิลเลชันสูงในผู้ป่วยโรคเนื้องอก
เนื้อเยื่ออ่อน ในงานประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 5 “งานวิชาการรับใช้สังคม”
จัดขึ้นวันที่ 26 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ อ.บางพลี จ.
สมุทรปราการ