

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเม็ดเลือดชั้นของ LINE1 และภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ในผู้ป่วย
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ



นางสาวมธุรดา เพชรสังข์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Relationship between LINE1 methylation and oxidative stress in bladder cancer patients



Miss Maturada Patchesung

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชั่นของ LINE1 และ
ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะ
ปัสสาวะ

โดย

นางสาวมธุรดา เพชรสังข์

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า)


..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วลัยยา ฐเนศพงศ์ธรรม)

มธุรดา เพชรสังข์ : ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชั่นของ LINE1 และภาวะ
เครียดจากออกซิเดชั่น ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ. (Relationship between
LINE1 methylation and oxidative stress in bladder cancer patients) อ. ที่
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ์, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.
ดร. ชาญชัย บุญหล้า , 91 หน้า.

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับการ
เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นน่าจะสัมพันธ์กับ
การลดลงของระดับเมทิลเลชั่น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับเมทิลเลชั่นของ long
interspersed nuclear element1 (LINE1) ซึ่งเป็นตัวแทนของการเกิดเมทิลเลชั่นของทั้งจีโนม เพื่อประเมิน
ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น (total
antioxidant status (TAS) และ protein carbonyl) ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยรวบรวมกลุ่ม
ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 61 ราย และกลุ่มคนปกติจำนวน 45 ราย แล้ววัดระดับการเกิด
LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็ง ด้วยวิธี combined
bisulfate restriction analysis of LINE1 (COBRA LINE1) วัดระดับ TAS ในปัสสาวะ และระดับ protein
carbonyl ในพลาสมา ด้วยวิธี DPPH และ DNPH assay ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยมะเร็ง
กระเพาะปัสสาวะมีระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคน
ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าระดับ LINE1 methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็ง
กระเพาะปัสสาวะต่ำกว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะและเซลล์เม็ดเลือดขาว
ตามลำดับ นอกจากนี้ระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะมี
ความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ผลการศึกษาระดับตัวบ่งชี้ภาวะ
เครียดจากออกซิเดชั่นพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ TAS ต่ำแต่มีระดับ protein carbonyl
สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมี
ความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS แต่สัมพันธ์เชิงลบกับระดับ protein carbonyl ผลการศึกษาระดับ
ระดับรูปแบบของการเกิด LINE1 methylation คือ ¹⁴C (hypomethylated) และ ¹⁵C (partially
methylated) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ ¹⁴C ของเซลล์ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มคนปกติ
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ ROC analysis พบค่า AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.848 สรุป
ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะและมี
ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นสูงกว่าคนปกติ และยังพบว่าระดับ LINE1 methylation ที่ต่ำลงสัมพันธ์กับ
ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นที่สูงขึ้นและการตรวจวัด ¹⁴C ของเซลล์ในปัสสาวะ อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับ
โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้

ภาควิชา :ชีวเคมี.....
สาขาวิชา :ชีวเคมีทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา :2553.....

ลายมือชื่อนิสิต *อรุณ วรรณพงษ์*
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก *Dr. Piya-ratana Itasukwong*
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม *Dr. Chanachai Boonlaha*

5274798030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : BLADDER CANCER/ EPIGENETICS/ LINE1 METHYLATION/
OXIDATIVE STRESS

MATURADA PATCHSUNG : RELATIONSHIP BETWEEN LINE1
METHYLATION AND OXIDATIVE STRESS IN BLADDER CANCER PATIENTS.
ADVISOR : PROF. PIYARATANA TOSUKHOWONG, CO-ADVISOR : ASST.
PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., 91 pp.


Oxidative stress and epigenetic change are well recognized to involve in the development of bladder cancer (BCA). We hypothesize that increased oxidative stress is associated with hypomethylation of DNA. The present study aimed to determine whether methylation level at the long interspersed nuclear elements-1 (LINE1), as a reflective of global DNA methylation, in peripheral blood derived DNA was associated with levels of oxidative stress markers (total antioxidant status (TAS) and protein carbonyl) in BCA patients. Sixty-one BCA patients and 45 healthy individuals were recruited for the study. DNA methylation of LINE1 in peripheral blood cells, urinary exfoliated cells and cancerous tissue was measured by combined bisulfite restriction analysis of LINE1 (COBRA LINE1). Urinary TAS and plasma protein carbonyl were determined by DPPH and DNPH methods, respectively. LINE1 methylation in peripheral blood and urinary exfoliated cells of BCA patients were significantly lower than that of healthy controls. In BCA patients, LINE1 methylation in cancerous tissues was significantly lower than that in urinary exfoliated and peripheral blood cells, respectively. Both LINE1 methylation in blood and urinary cells were positively correlated with LINE1 methylation in cancerous tissues. Urinary TAS in BCA patients was significantly decreased, while plasma protein carbonyl was increased, compared to healthy controls. Interestingly, LINE1 methylation of blood circulating cells was positively correlated with urinary TAS, but reversely correlated with plasma protein carbonyl. Two methylated patterns of LINE1 were investigated, ${}^4\text{C}^4\text{C}$ (hypomethylated) and ${}^3\text{C}^4\text{C}$ (partially methylated). The ${}^4\text{C}^4\text{C}$ level in urinary exfoliated cells was significantly higher in BCA patients than healthy controls. Based on ROC analysis, ${}^4\text{C}^4\text{C}$ determination provided the best diagnostic potential with an area under curve of 0.848. In conclusion, patients with BCA manifested hypomethylation of LINE1 in peripheral blood cells as well as urinary exfoliated cells. BCA patients had higher oxidative stress than healthy individuals. We demonstrated for the first time that hypomethylation of LINE1 was associated with enhanced oxidative stress in patients with BCA. Furthermore, ${}^4\text{C}^4\text{C}$ determination in urinary exfoliated cells could potentially be used as a diagnostic marker for BCA.

Department : Biochemistry

Field of Study : Medical Biochemistry

Academic Year : 2010

Student's Signature 

Advisor's Signature 

Co-advisor's Signature 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตรสุขโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ. ดร. ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม การนำเสนอ วิธีการทดลอง และให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานสอบ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นพ. อภิวัฒน์ มุทิตางกูร ที่ได้ให้คำแนะนำ และอนุญาตให้ใช้วิธีการวัดระดับเมทิลเลชั่น อีกทั้งยังเอื้อเพื่อให้ใช้ห้องทดลองและอุปกรณ์ต่างๆ และยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่ๆและน้องๆ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวัดระดับเมทิลเลชั่นและให้คำแนะนำในหลายๆ เรื่อง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นพ. สุสันต์ ดิษยบุตร ที่ช่วยเตรียมความพร้อมในการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่นๆ ทั้งในและนอกภาควิชาชีวเคมีที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการสอบปกป้องและทำวิทยานิพนธ์อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การจัดทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ที่เป็นผู้อุปการะในทุกๆ ด้านของชีวิต ขอขอบคุณญาติพี่น้อง เพื่อนๆ ระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
ประชากร.....	19
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	21
การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	23
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	31
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
การศึกษาในระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ.....	36

บทที่	หน้า
การศึกษาระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะ ปัสสาวะ.....	39
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือด ขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ....	40
การศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น.....	46
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจาก ออกซิเดชั่นในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	47
การศึกษาคุณค่าทางคลินิกในการวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของการ ตรวจวัด LINE1 methylation และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น.....	51
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	57
สรุปผลการวิจัย.....	57
อภิปรายผลการวิจัย.....	58
ข้อเสนอแนะ.....	61
รายการอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	85
ภาคผนวก ง.....	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91

สารบัญญัตราจ

ตารางที่		หน้า
1	เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	21
2	แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR (PCR protocol).....	30
3	แสดงข้อมูลพื้นฐานพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างประชากรผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะ	34
4	แสดงข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ใช้ในการศึกษา.....	39
5	ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เทียบกับในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยแต่ละราย.....	38
6	แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็ง ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	42
7	แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมคนปกติ.....	44
8	การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระหว่างระดับ LINE1methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	48
9	การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระหว่างระดับ LINE1methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ.....	50
10	แสดงค่า AUC ค่า sensitivity และ specificity ของการตรวจวัดระดับ methylation ระดับ partial methylation และ ระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ และการตรวจวัดระดับ TAS ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และกลุ่มควบคุมคนปกติ.....	51
11	ผลการคำนวณค่า sensitivity และ specificity เมื่อมีการตรวจร่วมสองอย่างเพื่อวินิจฉัยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของกระบวนการภายในเซลล์ 5 กระบวนการ.....	8
2	แสดงกระบวนการก่อมะเร็ง (carcinogenesis) ที่สามารถแบ่งระยะการเกิดมะเร็งเป็นอย่างน้อย 3 ระยะ.....	10
3	กลไกของกระบวนการ DNA methylation	11
4	แสดงเอนไซม์ DNMTs และซับสเตรตที่ใช้ในกระบวนการ maintenance และ de novo DNA methylation ของ genomic DNA	12
5	ส่วนประกอบของ active LINE1 ที่มีขนาดประมาณ 6 kb.....	13
6	แสดงหลักการของการวัดระดับ LINE1 methylation ด้วยวิธี COBRA LINE1..	15
7	แสดงขั้นตอนการสร้าง glutathione จากกรดอะมิโน homocystein.....	17
8	หลักการวัด protein carbonyl โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay โดยยกตัวอย่างการถูกออกซิไดซ์ที่กรดอะมิโน proline ของโปรตีน	24
9	แสดงความสามารถในการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่เปลี่ยนไปเมื่อถูกยับยั้งด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ.....	26
10	กลไกการเกิด bisulfite conversion ของ unmethylated cytosine	28
11	ปฏิกิริยา PCR ของ DNA template ที่ถูก treat ด้วย bisulfite	28
12	ตัวอย่างเจลแสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส.....	32
13	ตัวอย่างกราฟ ROC.....	33
14	Box-Whisker plot แสดงระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคนปกติ	36
15	Box-Whisker plot แสดงระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคน.....	38
16	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์แต่ละชนิดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	41

ภาพที่	หน้า	
17	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation (${}^mC{}^uC$) และระดับ hypomethylation (${}^uC{}^uC$) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	43
18	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มควบคุมคนปกติ.....	45
19	Box-Whisker plot แสดงระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	46
20	Box-Whisker plot แสดงระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ.....	47
21	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็ง.....	49
22	Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ.....	51
23	แสดง ROC curve ของระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ.....	54
24	แสดง ROC curve ของระดับ urinary TAS และระดับ plasma protein carbonyl	55

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine
APS	ammonium persulfate
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BMI	body mass index
COBRA	combined bisulfite restriction analysis
DNMT	DNA methyltransferase
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GdmCl	guanidine hydrochloride
GSH	glutathione
LINE1	long interspersed nuclear element 1
OD	optical density
PBS	phosphate buffer saline
ROS	reactive oxygen species
SAH	s-adenosylhomocysteine
SAM	s-adenosylmethionine
SD	standard deviation
TAS	total antioxidant status
TCC	transitional cell carcinoma
TEMED	tetramethylethylenediamine
TUR-BT	transurethral reduction of bladder tumor
UC	urothelial carcinoma

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) เป็นโรคระบบทางเดินปัสสาวะที่พบได้ทั่วโลก โดยพบบ่อยเป็นอันดับสองในกลุ่มมะเร็งทางเดินปัสสาวะ และเป็นลำดับที่หกจากมะเร็งทุกชนิด อุบัติการณ์โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆทั่วโลก (1) จากสถิติมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ 3-4 เท่า และความเสี่ยงการเกิดมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ (2) ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่อายุมากกว่า 55 ปีขึ้นไป (3) ในประเทศไทยอุบัติการณ์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบได้ประมาณ 4.2 รายในเพศชายและ 1.3 รายในเพศหญิง ต่อประชากร 100,000 ราย (4) ร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นชนิด urothelial carcinoma (UC) ซึ่งมีอัตราการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) สูงถึงร้อยละ 80 ภายในเวลา 5 ปี (5) เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะไม่มีอาการผิดปกติอย่างอื่น ยกเว้นการพบปัสสาวะเป็นเลือดโดยไม่มีอาการเจ็บปวด ทำให้การวินิจฉัยพบมะเร็งชนิดนี้ล่าช้า และผู้ป่วยร้อยละ 20-30 (6) พบว่ามีการลุกลามเข้าสู่ชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะแล้วเมื่อแรกวินิจฉัย ดังนั้นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจึงจัดเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุในประเทศไทย

กระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อาศัยปัจจัยร่วมหลากหลาย (complex and multifactorial process) ชักนำไปให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การสูบบุหรี่ (7) และความเสี่ยงจะสูงขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น (3) ในควันบุหรี่มีสารอะโรมาติกเอมีน (aromatic amines) และสารก่อมะเร็ง (carcinogens) อื่นๆ หลายชนิด ที่จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มการผลิตของสารอนุมูลว่องไว (reactive species) และสารก่อมะเร็งสุดท้าย (ultimate carcinogens) ไปจับและทำลายดีเอ็นเอ (DNA adduct) ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง (8) ผลการศึกษาที่ผ่านมายืนยันว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (6) ภาวะเครียดจากออกซิเดชันไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic mutation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA) เท่านั้นแต่ยังมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic change) อีกด้วย

การควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับการถอดรหัส (transcriptional control) เช่น กระบวนการเติมหมู่เมทิลของ

ดีเอ็นเอ (DNA methylation) กระบวนการเติมหมู่อะซิetylของโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) และ กระบวนการตัดหมู่อะซิetyl (histone deacetylation) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงของภาวะเหนือพันธุกรรม หลายแบบ เช่น 1) global hypomethylation 2) hypermethylation ของ tumor suppressor genes และ 3) hypomethylation ของ oncogenes แต่ที่พบบ่อยและมีรายงานมากที่สุดคือ global hypomethylation (9-11)

กลไกการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ อาศัย เอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) และใช้ s-adenosylmethionine (SAM) เป็น methyl donor หมู่เมทิลจะถูกเติมให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ในบริเวณ CpG dinucleotides หรือ CpG Islands หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน แต่ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด เมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือมีปริมาณสารอนุมูลอิสระสูง เซลล์จะสร้างกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) เพิ่มมากขึ้น จากกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่สลายจากกรดอะมิโนโฮโมซิสเทอีน (homocysteine) ทำให้ปริมาณโฮโมซิสเทอีนลดลง จึงเพิ่มการสร้างโฮโมซิสเทอีนจากกรดอะมิโนเมไทโอนีน (methionine) ซึ่งต้องใช้ SAM ร่วมด้วย ทำให้ปริมาณ SAM ในเซลล์ลดลง และส่งผลต่อกระบวนการ DNA methylation (12) นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระยังเป็นต้นเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย โดยการไปออกซิไดซ์เบสกวานีน (guanine) เกิดเป็น 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) แม้จะเกิดอย่างไม่จำเพาะแต่ก็อาจเกิดขึ้นได้ในบริเวณ CpG dinucleotides ซึ่งมีผลขัดขวางการจับของเอนไซม์ DNMT ในการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกับเบสกวานีนตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น (13, 14) อีกทั้งความเสียหายของดีเอ็นเอ ยังรบกวนความสามารถของดีเอ็นเอในการทำหน้าที่เป็นสับสเตรต (substrate) สำหรับ DNMT ด้วย (15) ดังนั้นจากกลไกที่กล่าวนี้ เมื่อมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงน่าจะส่งผลให้เกิดการลดลงของ DNA methylation ของทั้งจีโนมหรือ global DNA hypomethylation ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

Long Interspersed Nuclear Element 1 (LINE1) ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนมหรือ global methylation เนื่องจาก LINE1 เป็น retrotransposon ที่มีมากมายกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของมนุษย์ (16) คิดเป็นประมาณ 17% ของดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม (17) ซึ่งในภาวะส่วนใหญ่จะอยู่ในสถานะที่ไม่สามารถเกิดการลอกรหัสได้ (silent หรือ inactive) LINE1 ที่สามารถเกิดการลอกรหัสได้หรือ active LINE1 สามารถจำลองตัวเองแล้วเคลื่อนที่ไปแทรกตำแหน่งอื่น ๆ ในจีโนม (retrotransposition) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) และความไม่เสถียรของจีโนม (genome instability) ซึ่งนำมาสู่การเกิดโรค

ทางพันธุกรรม (genetic diseases) (18) และโรคมะเร็งได้ (19) สำหรับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายการศึกษาที่พบ hypomethylation ของ LINE1 (9, 11, 20)

เนื่องจากเมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานที่ LINE1 hypomethylation สัมพันธ์กับการเพิ่มความถี่ของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (20) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (6, 21) แต่ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับการเกิด LINE1 methylation มาก่อน ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันน่าจะสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ LINE1 methylation ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเทียบกับคนปกติสุขภาพดี และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งถือเป็นการศึกษาแรกในประเทศไทย และผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกทาง epigenetics ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากขึ้นและเป็นประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ
2. เพื่อตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
3. เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งกับระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
4. เพื่อศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด superficial transitional cell carcinoma และกลุ่ม

คนปกติที่มีสุขภาพดี ซึ่งเป็นบุคคลทั่วไปที่มีสุขภาพแข็งแรง โดยประเมินจากการสัมภาษณ์และผลตรวจสุขภาพประจำปี ไม่มีโรคมะเร็งที่ระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ มีอายุและเพศตรงกับผู้ป่วยที่ต้องการศึกษาวิจัย (age and sex matched healthy controls)

2. ระยะเวลา การศึกษาวิจัยครั้งนี้กระทำในปีการศึกษา 2553 เป็นเวลา 1 ปี
3. สถานที่ที่ใช้ในการวิจัย คือ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 717/1 และห้อง 713 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ
2. กลุ่มผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาค้างนี้เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งผู้ป่วยมีภูมิลำเนาอยู่ในทุกภูมิภาคของประเทศไทยและกลุ่มคนปกติเป็นบุคคลทั่วไปรวมทั้งเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และสภากาชาดไทย
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัยและมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจภายหลังจากได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้านรวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษาค้างนี้ต้องรวบรวมกลุ่มคนปกติผู้สูงอายุที่ไม่เป็นโรคมะเร็งระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งผู้สูงอายุเหล่านี้อาจมีความผิดปกติของระบบอื่น โดยเฉพาะโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ร่วมด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องคัดอาสาสมัครที่ไม่มีโรคมะเร็งที่ระบบทางเดินปัสสาวะ แต่มีภาวะเสี่ยงต่อโรสดังกล่าวเพียงเล็กน้อยเข้าศึกษาเป็นกลุ่มคนปกติด้วย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Bladder cancer หรือโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เป็นมะเร็งที่เกิดที่กระเพาะปัสสาวะซึ่งเป็นถุงสำหรับเก็บน้ำปัสสาวะ มีตำแหน่งอยู่ในช่องท้องระดับหัวเหน่า ส่วนใหญ่เกิดขึ้นมาจากเซลล์เยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งขึ้นมา ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นก้อนเนื้อขนาด

ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนอาจเต็มกระเพาะปัสสาวะ และอาจแผ่ขยายลุกลามออกไปยังอวัยวะข้างเคียงได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด

2. Superficial bladder cancer เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดไม่ลุกลาม คือ มะเร็งยังไม่ลุกลามไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ มี 3 ระยะตามระดับความรุนแรง ได้แก่ T_{is} (*in situ* carcinoma) T_a (non-invasive papillary tumor) และ T_1 (limited to lamina propria invasion)
3. TUR-BT (transurethral resection of bladder tumor) เป็นการผ่าตัดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้กล้อง (cystoscope) เข้าสู่กระเพาะปัสสาวะผ่านท่อปัสสาวะ แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าจี้ไปที่ก้อนมะเร็งเพื่อขูดเอาก้อนมะเร็งออก
4. Epigenetics หรือการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม เป็นการควบคุมการแสดงออกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการลำดับเบส (sequence) ของยีน ตัวอย่างเช่น การดัดแปลงโครมาติน (chromatin modification) และ DNA methylation
5. DNA methylation ปฏิกริยาการเติมหมู่เมทิล ให้ดีเอ็นเอ เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอ โดยการเติมหมู่เมทิลไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกับกวานีน (CpG dinucleotide) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่พบ CpG ค่อนข้างหนาแน่น (CpG islands) คือบริเวณ promoter และส่วนต้นของ exon ตำแหน่งที่ 1
6. oxidative stress หรือ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ ภาวะไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ มีระดับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ทำให้สูญเสียหน้าที่หรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (cell injury) และถูกทำลาย (cell damage) ตามมา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับการเกิด LINE1 methylation ของ DNA ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
2. ทราบระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation ของ DNA กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
4. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation ของ DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติ จำนวน 45 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 61 ราย เก็บสารตัวอย่างเลือด ปัสสาวะตอนเช้า (morning urine) และเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ สำหรับกลุ่มคนปกติเก็บเพียงสารตัวอย่างเลือดและปัสสาวะตอนเช้า เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตรวจวัดระดับของ protein carbonyl ในเลือด โดยใช้วิธี spectrophotometric DNPH assay และ total antioxidant status (4) ในปัสสาวะ โดยใช้วิธี spectrophotometric DPPH assay เพื่อศึกษาภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และนำสารตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบระดับการเกิด methylation ของ LINE1 โดยวิธี Combined bisulfite restriction analysis of LINE1 (COBRA LINE1)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ดำเนินการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ผลการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์
2. จัดทำนิพนธ์ต้นฉบับภาษาอังกฤษ (บางส่วนของผลงานวิทยานิพนธ์) เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ใน proceeding ของการประชุมระดับนานาชาติ เรื่อง การประชุมทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล ครั้งที่ 3 (The 3rd Biochemistry and Molecular Biology (BMB) International Conference) ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

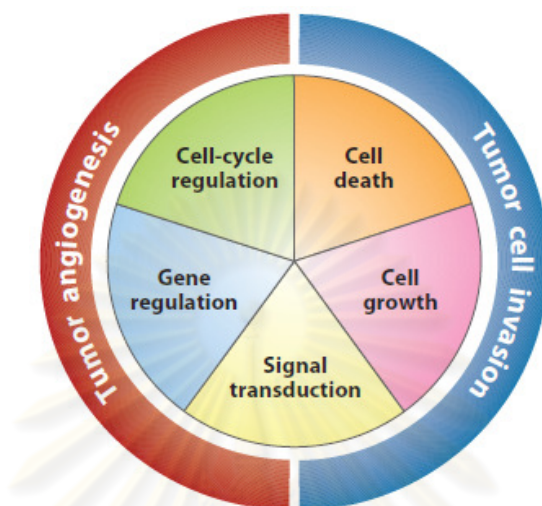
โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer, BCA)

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลก และอุบัติการณ์มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบมากเป็นอันดับที่ 6 ของมะเร็งที่พบทั่วโลก (1) และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 4 ในเพศชาย และลำดับที่ 8 ในเพศหญิง (22) อุตติการณเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในเพศชายสูงกว่าเพศหญิงประมาณ 3-4 เท่า (23) โดยมีความเสี่ยงสูงขึ้นตามอายุที่มากขึ้น ส่วนใหญ่พบในกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป (3) ในประเทศไทยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบได้ประมาณ 4.2 รายในเพศชายและ 1.3 รายในเพศหญิง ต่อประชากร 100,000 ราย (4) ประมาณร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่พบเป็นชนิด urothelial carcinoma (UC) หรือชื่อเดิมเรียกว่า transitional cell carcinoma (TCC) (24) มะเร็ง UC แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ superficial type และ muscle-invasive type ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีวิธีการรักษาต่างกัน สำหรับการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด superficial type ส่วนใหญ่จะใช้วิธีขูดเนื้อมะเร็ง (transurethral resection of bladder tumor, TUR-BT) ตามด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดคือ Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ฉีดเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (intravesicular infusion) เพื่อป้องกันไม่ให้โรคกลับเป็นใหม่ (25) แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบอัตราการกลับเป็นมะเร็งซ้ำภายหลังการผ่าตัด สูงถึงร้อยละ 80 ภายในระยะเวลา 5 ปี (24) และมีผู้ป่วยเป็นจำนวนมากที่ไม่ตอบสนองต่อยาดังกล่าว

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือการสูบบุหรี่ พบว่าคนที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งมากกว่าในคนที่ไม่สูบบุหรี่ 2-4 เท่า ซึ่งอัตราเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนบุหรี่และระยะเวลาที่สูบบุหรี่ (7) เนื่องจากในควันบุหรี่มีสารอะโรมาติกเอมีน และสารก่อมะเร็งอื่นๆอีกจำนวนมาก (8) ส่วนปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น การได้รับสารหนู (arsenic) ในน้ำดื่มและอาหารทะเลบางชนิด (26) การทำงานในโรงงานผลิตสีและยาง (27) การได้รับสารก่อมะเร็งและสารพิษเหล่านี้จะทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เกิดสารอนุมูลอิสระ (reactive species) และการทำลายดีเอ็นเอ อันเป็นสาเหตุของการสะสมการกลายพันธุ์ของยีนจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

การเกิดมะเร็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อาศัยปัจจัยจำนวนมากร่วมกันชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง (malignant transformation) ไม่ได้เกิดขึ้นจากความผิดปกติเพียงจุดใดจุดหนึ่ง สำหรับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของกระบวนการภายในเซลล์ 5 กระบวนการ ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็งจากภายนอกเซลล์ ได้แก่ 1) การควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle regulation) 2) การตายของ

เซลล์ (cell death) 3) การเติบโตของเซลล์ (cell growth) 4) การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) และ 5) การควบคุมการทำงานของยีน (gene regulation) เมื่อเซลล์มีความผิดปกติมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้สูญเสียการควบคุมภายในเซลล์ และเกิดเป็นมะเร็งขั้นในที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 1 (28)



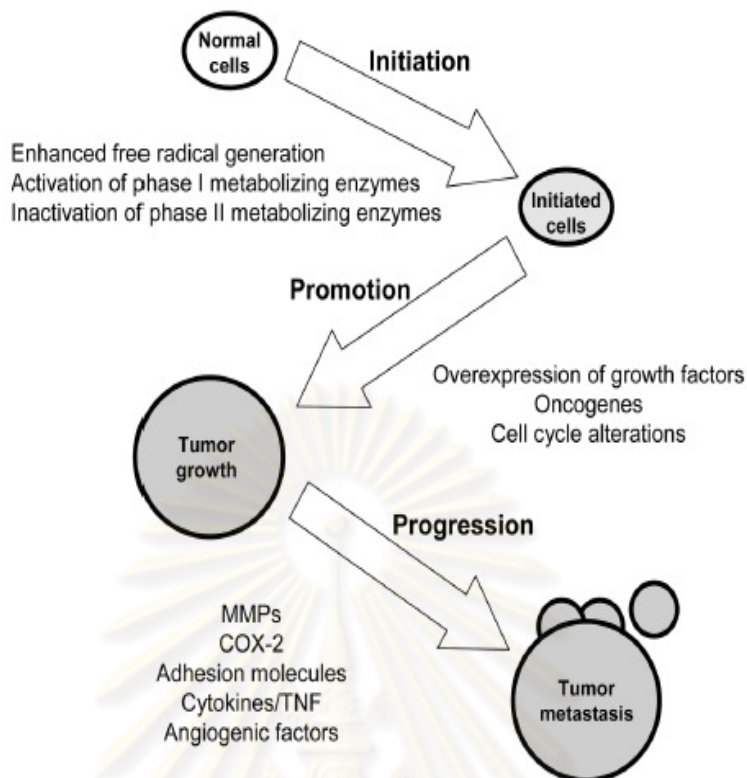
ภาพที่ 1 แสดงการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของกระบวนการภายในเซลล์ (intrinsic processes) 5 กระบวนการ ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็งจากภายนอกเซลล์ แล้วทำให้การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ได้แก่ 1) การควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle regulation) 2) การตายของเซลล์ (cell death) 3) การเติบโตของเซลล์ (cell growth) 4) การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) และ 5) การควบคุมการทำงานของยีน (gene regulation) สำหรับการควบคุม (maintenance) การก้าวหน้า (progression) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ขึ้นอยู่กับกระบวนการภายนอกเซลล์ (extrinsic processes) 2 กระบวนการ ได้แก่ 1) การสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง (tumor angiogenesis) และ 2) การบุกรุกเนื้อเยื่อข้างเคียงของเซลล์มะเร็ง (tumor invasion)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และการก่อมะเร็ง

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

โมเลกุลในเซลล์ถูกทำลายจะทำให้สูญเสียหน้าที่และส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) แต่ในสภาวะปกติร่างกายมีกระบวนการที่จะทำลายหรือยับยั้งความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมได้ โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) หรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS scavengers) หลายชนิดทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) และได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น แต่ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากเกินไปกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะต้านหรือป้องกันได้ ภาวะนี้เรียกว่า ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลของเซลล์จนเกิดพยาธิสภาพของเซลล์หรือเกิดโรคขึ้น สารชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมายคือ ไขมัน โปรตีน และสารพันธุกรรม จะถูกออกซิไดส์กลายเป็นผลิตภัณฑ์ออกซิเดชัน (oxidative damage products) เช่น malondialdehyde (MDA) จากไขมัน protein carbonyl จากโปรตีน และ 8-hydroxydeoxy guanine (8-OHdG) จากดีเอ็นเอ เป็นต้น หลายการวิจัยแสดงให้เห็นว่า oxidative stress มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด อาทิเช่น โรคหัวใจ (29) โรคเบาหวาน (30) โรคไตและโรคเนื้อไต (31) เป็นต้น และมีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ (6, 21) และเป็นที่ยอมรับกันว่า oxidative stress เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (21, 32)

กระบวนการก่อมะเร็ง (carcinogenesis) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อนมาก สามารถแบ่งระยะการเกิดมะเร็งเป็นอย่างน้อย 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเริ่มก่อตัว (initiation) ระยะส่งเสริม (promotion) และระยะก้าวหน้า (progression) แต่ละระยะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2) (33) ดีเอ็นเอที่เสียหายจากภาวะ oxidative stress สามารถชักนำให้เกิดระยะเริ่มก่อตัวของมะเร็งได้ ยกตัวอย่างเช่น 8-OHdG เป็น oxidative DNA damage product เกิดจากสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเบสกวีนีน (guanine) บนสายดีเอ็นเอ ซึ่งเป็น oxidative DNA damage product ที่พบได้บ่อยที่สุด (34, 35) สามารถทำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) ขึ้นได้ คือการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น T (G-T transversions) (36) ดังนั้นถ้าเกิดภาวะ oxidative stress สูงก็จะทำให้เกิดการสะสมของการกลายพันธุ์ในเซลล์ปริมาณมาก โดยเฉพาะในยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) และยีนมะเร็ง (oncogenes) จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง



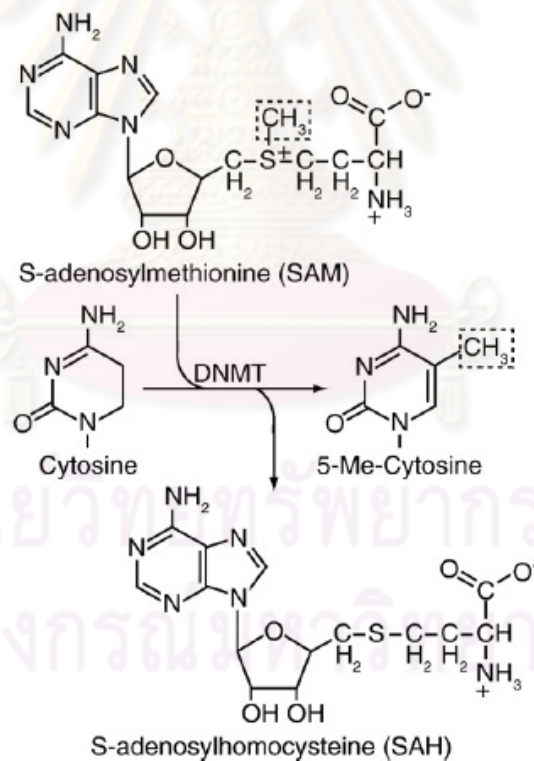
ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการก่อมะเร็ง (carcinogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อนมาก สามารถแบ่งระยะการเกิดมะเร็งเป็นอย่างน้อย 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเริ่มก่อตัว (initiation) ระยะส่งเสริม (promotion) และระยะก้าวหน้า (progression) แต่ละระยะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลและเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น ในระยะเริ่มก่อตัว มีการผลิตสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น การกระตุ้นเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยาระยะที่ 1 (phase I enzyme) เปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งที่ยังไม่มีฤทธิ์ (procarcinogen) เป็นสารก่อมะเร็งที่มีว่องไวหรือสารก่อมะเร็งสุดท้าย (ultimate carcinogens) ในอีกด้านยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยาระยะที่ 2 (phase II enzyme) ที่เหนี่ยวนำให้เพิ่มการทำลายฤทธิ์หรือลดความว่องไวต่อปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง เป็นต้น

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) และการก่อมะเร็ง

การควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับการถอดรหัส (transcriptional control) เช่น กระบวนการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ (DNA methylation) กระบวนการเติมหมู่อะซิetylของโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) และ กระบวนการตัดหมู่อะซิetyl (histone deacetylation) กระบวนการ DNA methylation มีความสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็ง เนื่องจาก DNA methylation มีผลโดยตรงต่อ

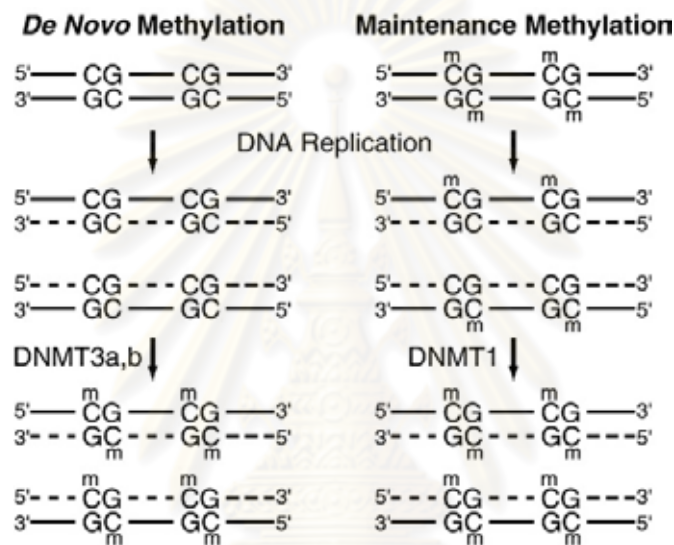
การเกิด transcription ของยีน กระบวนการ DNA methylation เป็นการดัดแปลงดีเอ็นเอที่ไม่ทำให้ลำดับเบสมีการเปลี่ยนแปลง สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยการเติมหมู่เมทิล (methyl, CH_3) ไปแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในเบสไซโตซีน (cytosine, C) ที่อยู่ติดกับกวานีน (guanine, G) หรือ CpG (CpG dinucleotide) ซึ่งถ้าตำแหน่ง promoter ของยีนมี methylation สูง จะยับยั้งการเข้าจับของ RNA polymerase ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (gene repression) นั้น ในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่จะพบ promoter hypermethylation ของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) (37-40) และ promoter hypomethylation ของยีนมะเร็ง (oncogene) (41-44)

กลไกการเติมหมู่เมทิล อาศัย เอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) โดยเอนไซม์ DNMT จะเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เมทิลจาก s-adenosylmethionine (SAM) ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ให้หมู่เมทิล (methyl donor) ไปที่ตำแหน่งที่ 5 ของ วงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5-MeC) และ SAM เปลี่ยนเป็น s-adenosylhomocysteine (SAH) ดังแสดงในภาพที่ 3 (12)



ภาพที่ 3 แสดงกลไกของกระบวนการ DNA methylation โดยอาศัย เอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMT) เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เมทิลจาก s-adenosylmethionine (SAM) ไปที่ตำแหน่งที่ 5 ของ วงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) ของเบสไซโตซีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine (5-MeC) และ SAM เปลี่ยนเป็น s-adenosylhomocysteine (SAH)

เอนไซม์ DNMTs ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) มี 3 ชนิด ได้แก่ 1) DNMT1 2) DNMTa และ 3) DNMTb โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทตามความสามารถในการจับกับซัสเตรตซึ่งก็คือ CpG dinucleotide ที่แตกต่างกัน (45) ประเภทแรกได้แก่ เอนไซม์ DNMT1 เร่งปฏิกิริยาของกระบวนการ maintenance DNA methylation (46) เพราะสามารถจับได้ดีกับ hemimethylated CpG (47) ประเภทที่สอง ได้แก่ เอนไซม์ DNMTa และ DNMTb เร่งปฏิกิริยาของกระบวนการ de novo DNA methylation เพราะสามารถจับได้ดีกับ unmethylated CpG (48) ดังแสดงในภาพที่ 4 (12)

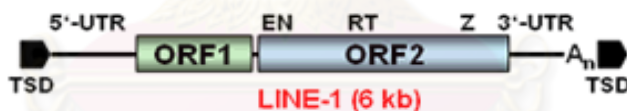


ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการ maintenance และ de novo DNA methylation ของ genomic DNA โดยกระบวนการ maintenance DNA methylation เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DNMT1 และมี hemimethylated CpG เป็นซัสเตรต กระบวนการ de novo DNA methylation เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DNMTa และ DNMTb มี unmethylated CpG เป็นซัสเตรต

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีนหลายยีนในเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงแบบแผนของ DNA methylation (DNA methylation pattern) แต่การเปลี่ยนแปลงแบบที่พบได้ทั่วไปในโรคมะเร็งในคนนั้นมี 2 แบบได้แก่ 1. global hypomethylation ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนมะเร็ง (oncogene) โดยเกิดขึ้นในช่วงต้นระยะ progression ของการเกิดมะเร็ง และ 2. regional hypermethylation ของ CpG island ที่ทำให้ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ไม่สามารถแสดงออกได้(49) นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิด global hypomethylation ทำให้อัตราการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นนำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม (genome instability) ในที่สุด (50) ซึ่ง

แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงแบบแผนของ DNA methylation ที่ทำให้การแสดงออกของยีนผิดปกติไปนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

ปัจจุบันใช้ระดับ methylation ใน Long Interspersed Nuclear Element (LINE1) เป็นตัวแทนของระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนม (global hypomethylation) (10, 11) เนื่องจาก LINE1 พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มีลักษณะเป็นช่วงของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำกันปานกลาง แต่ละชุดที่ซ้ำกันนี้อยู่ติดกันเป็นช่วงยาวๆ แต่ละชุดที่ซ้ำกันลำดับเบสอาจจะไม่เหมือนกันทั้งหมด แต่จะคล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กัน LINE1 มีคุณสมบัติเป็น retrotransposon คือสามารถจำลองตัวเองขึ้นมาแล้วไปแทรกแบบสุ่มในบริเวณอื่นของจีโนมได้ ซึ่งในจีโนมของมนุษย์มี LINE1 มากกว่า 600,000 copy คิดเป็นประมาณ 17% ของดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม (17, 51) LINE1 ที่สามารถเกิดการลอกรหัสได้หรือ active LINE1 สามารถจำลองตัวเองแล้วเคลื่อนที่ไปแทรกตำแหน่งอื่นๆ ในจีโนม (retrotransposition) มีประมาณ 3000-4000 copy (52) มีขนาดประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 1) 5'-untranslated region (UTR) ซึ่งมีบริเวณที่เป็น promoter สำหรับ RNA polymerase II อยู่ด้วย 2) 2 open reading frame ได้แก่ ORF1 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด และ ORF2 ซึ่งประกอบด้วย 3 domain ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ endonuclease เอนไซม์ reverse transcriptase และเป็น 3' zinc finger-like domain และ 3) 3' UTR (18) ดังแสดงในภาพที่ 5



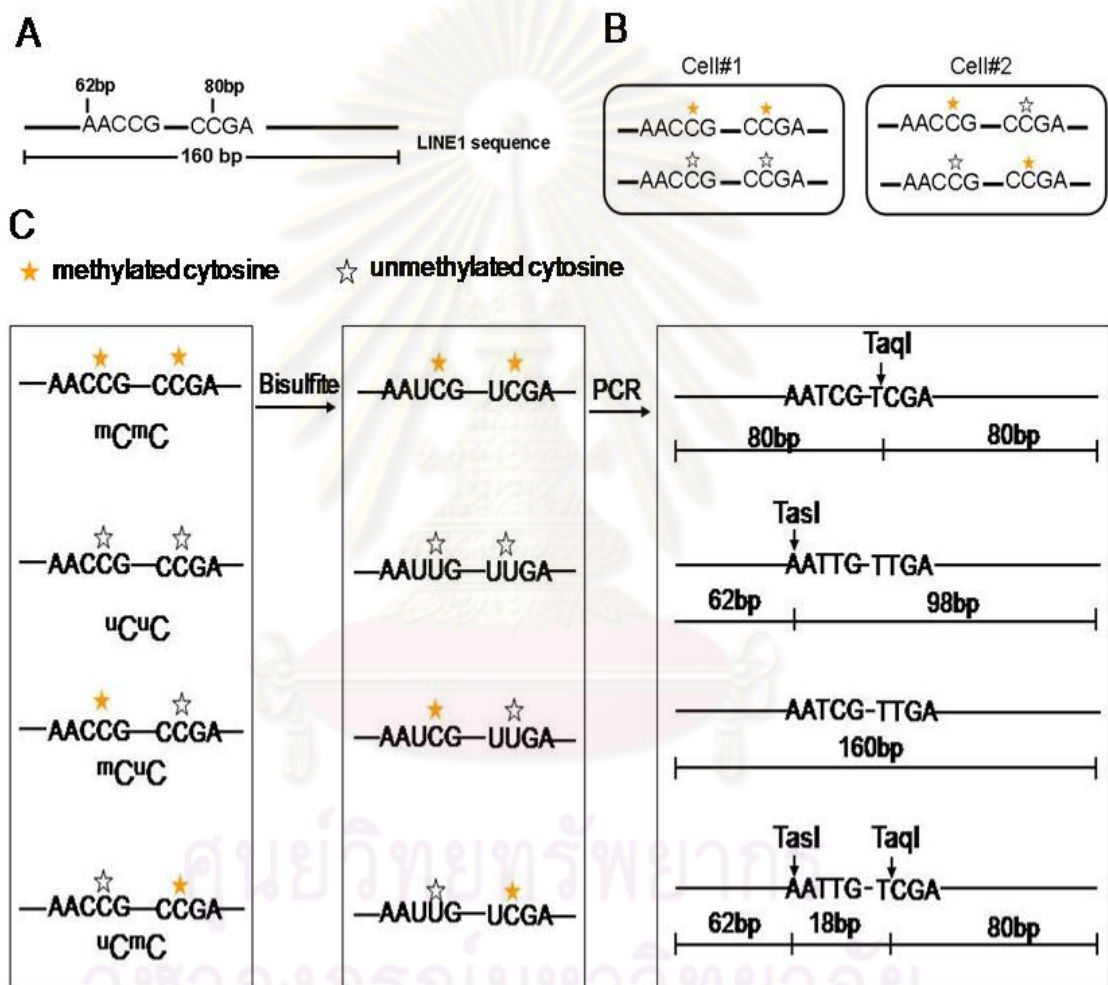
ภาพที่ 5 แสดงส่วนประกอบของ active LINE1 ที่มีขนาดประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 1) 5'-untranslated region (UTR) ซึ่งมีบริเวณที่เป็น promoter สำหรับ RNA polymerase II อยู่ด้วย 2) 2 open reading frame (ORF1 และ ORF2) และ 3) 3' UTR

มีการศึกษาเป็นจำนวนมากที่รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรมของ LINE1 ทำให้เกิดการพัฒนาของ primate cells ในระยะเริ่มก่อตัวของกระบวนการก่อมะเร็ง ทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (chromosome rearrangement) และในสำหรับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะการเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetic ที่พบมากที่สุดคือ global hypomethylation โดยมีหลายการศึกษาที่พบ LINE1 hypomethylation เช่น การศึกษาของ Choi และคณะ(9) โดยศึกษาระดับ LINE1 methylation ใน

เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder tumor tissue) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติที่อยู่ติดกัน (adjacent normal bladder urothelium) ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 34 ราย พบว่าระดับ LINE1 methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่าเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติ normal tissue อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ การศึกษาของ Wilhelm และคณะ(20) ที่ศึกษาระดับ LINE1 methylation ใน เซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood cells) ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 285 ราย เปรียบเทียบกับควบคุมคนปกติ จำนวน 465 ราย พบว่า ระดับ LINE1 methylation ที่ต่ำที่สุดสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะขึ้น 1.8 เท่า และเสนอว่า LINE1 hypomethylation อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สำคัญของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในเพศหญิงได้ สำหรับประเทศไทยการศึกษาของ Mutirangura และคณะ (11) พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ LINE1 hypomethylation อยู่ระหว่าง 65.37–70.98% ซึ่งสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ (64.36-65.90%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการตรวจหาระดับ DNA methylation ได้แก่ วิธี Methylation-specific PCR (MSP) (53, 54) วิธี pyrosequencing (9, 20) และวิธี combined bisulfite restriction analysis (COBRA) (55) ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี Combined bisulfite restriction analysis of LINE1 (COBRA LINE1) (11, 56) ซึ่งเป็นการหา DNA methylation แบบเชิงปริมาณ (quantitative) ที่สามารถวัดระดับ LINE1 methylation ได้อย่างแม่นยำและสามารถบอกรูปแบบการเกิด methylation ได้ การทำ COBRA LINE1 อาศัย 2 CpG 2 ตำแหน่ง ซึ่งมีลำดับเบส (sequence) คือ AACCG และ CCGA (ภาพที่ 6A) ซึ่งมีโอกาสเกิด methylation ได้ 2 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 ได้แก่ เซลล์ที่ 1 (cell#1) เกิด methylation ที่ CpG ทั้ง 2 ตำแหน่ง (complete methylation) บนโครโมโซมเดียวกัน และ unmethylation ที่ CpG ทั้ง 2 ตำแหน่ง (complete unmethylation) บนอีกโครโมโซมหนึ่ง และรูปแบบที่ 2 ได้แก่ เกิด methylation ที่ CpG เพียงตำแหน่งเดียว (partial methylation) บนทั้งสองโครโมโซม (ภาพที่ 6B) วิธีวัดระดับ methylation เริ่มจากนำดีเอ็นเอทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ซึ่งจะทำให้ unmethylated cytosine (C) เปลี่ยนเป็นเบส uracil (U) ในขณะที่ methylated cytosine ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อทำ PCR เบส uracil จะถูกเปลี่ยนเป็นเบส thymine (T) เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีลำดับเบสที่สามารถตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่แตกต่างกันได้แก่ TaqI ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ (recognition site) คือ TCGA และ TasI มีตำแหน่งจดจำคือ AATT ดังนั้นเมื่อผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfate และทำ PCR แล้ว unmethylated AACCG sequence จะถูกเปลี่ยนเป็น AATTG ซึ่งตัดได้ด้วยเอนไซม์ TasI และ methylated sequence CCGA ถูกเปลี่ยนเป็น TCGA ซึ่งตัดได้ด้วยเอนไซม์ TaqI ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดแตกต่างกันตามรูปแบบการเกิด methylation ได้แก่

1) hypermethylated loci ($^mC^mC$) 2) hypomethylated loci (uCuC) 3) partial methylated loci (mCuC) และ 4) partial methylated loci ($^uC^mC$) ดังแสดงในภาพที่ 6C เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) ย้อมแถบดีเอ็นเอ และวัดระดับความเข้ม (intensity) ของแถบดีเอ็นเอ ก็จะหาร้อยละการเกิดเมทิลเลชั่นได้ จากการนำ ความเข้มของ methylated bands หารด้วยผลรวมความเข้มของ methylated band และ unmethylated bands

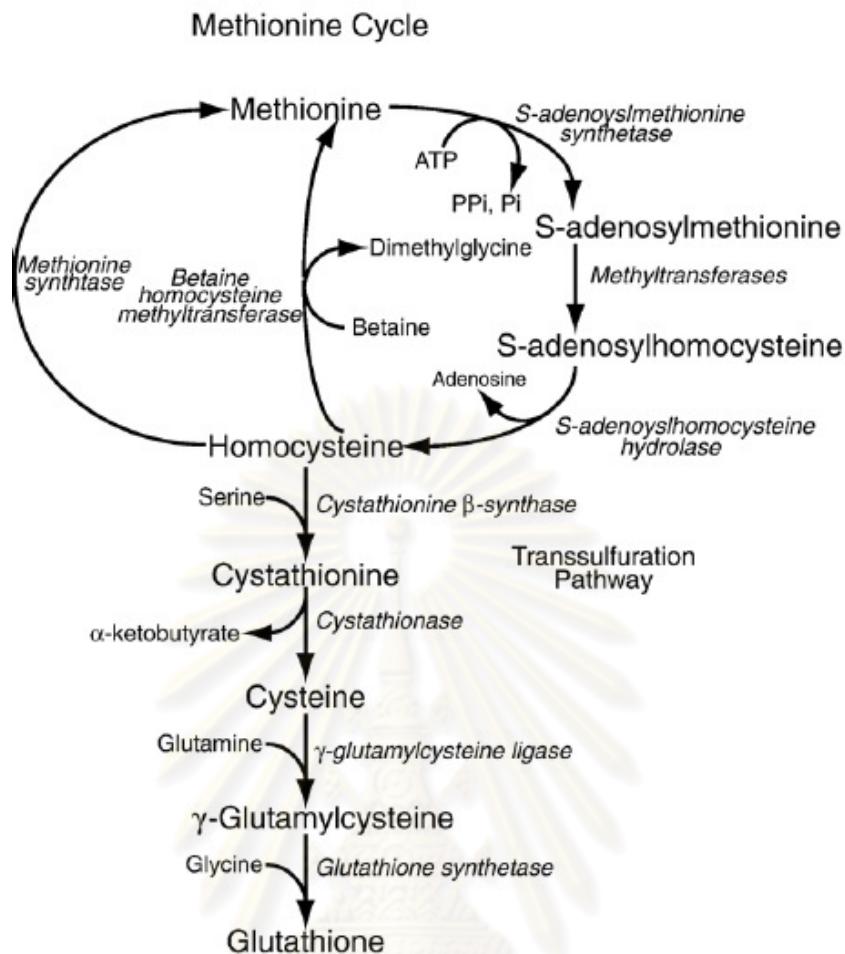


ภาพที่ 6 แสดงหลักการของการวัดระดับ LINE1 methylation ด้วยวิธี COBRA LINE1 A: แสดงลำดับเบสของตำแหน่ง CpG 2 ตำแหน่ง ของ LINE1 ขนาด 160 bp B: แสดงโอกาสการเกิด methylation ของ LINE1 C: แสดงลำดับขั้นตอนของการวัดระดับ LINE1 methylation ด้วยวิธี COBRA LINE1 โดยเริ่มจากการนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ TaqI และ TasI เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างการเกิด methylation และ unmethylation บน CpG 2 ตำแหน่งของ LINE1

ผลของ oxidative stress ต่อ DNA methylation

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

ภาวะ oxidative stress ส่งผลต่อ epigenetic change อย่างไรยังไม่เป็นที่ทราบ แน่ชัด อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่เสนอกลไกที่น่าจะเป็นไปได้เกี่ยวกับผลของสารอนุมูล ออิสระต่อ DNA methylation จากการที่ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล อาศัย เอนไซม์ DNMT และมี SAM ทำหน้าที่เป็นผู้ให้หมู่เมทิล เมื่อเซลล์เกิดภาวะ oxidative stress หรือมีปริมาณสารอนุมูล ออิสระสูง จะทำให้เซลล์ต้องสร้างกลูตาไทโอน (glutathione) เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการป้องกัน ความเสียหายจากสารออกซิแดนท์ (oxidants) หรือสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เนื่องจากกลูตาไทโอน เป็นกลไกหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งโดยปกติกลูตาไทโอนจะสร้างจาก กรดอะมิโน homocysteine ดังนั้นเมื่อมีภาวะ oxidative stress สูงจึงทำให้ปริมาณกรดอะมิโน homocysteine ที่ใช้สร้างกลูตาไทโอนไม่เพียงพอ เซลล์ต้องการ homocysteine เพิ่มมากขึ้น จึง ต้องสลาย SAM ที่สร้างมาจากกรดอะมิโน methionine มาเป็น homocysteine แทน (ภาพที่ 7) และในขณะเดียวกันก็ไม่มี homocysteine เหลือพอที่จะเปลี่ยนกลับไปเป็นกรดอะมิโน methionine จึงส่งผลให้ระดับของ methionine และ SAM ลดลง ทำให้ขาด SAM ที่จะไปใช้ใน กระบวนการ DNA methylation ส่งผลให้เกิด DNA methylation ลดลง (12) มีหลายการศึกษาที่ พบว่าการลดลงของ glutathione ทำให้ระดับของ SAM ในเซลล์ลดลงและนำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation (57-59) ซึ่งแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหรือการสร้าง glutathione จากภาวะ oxidative stress มีผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการ DNA methylation โดยการไปเปลี่ยนแปลงปริมาณ SAM ในเซลล์ (SAM pools)



ภาพที่ 7 แสดงการสร้าง glutathione จาก homocystein (transsulfuration pathway) เมื่อมีภาวะ oxidative stress สูงจึงทำให้ปริมาณกรดอะมิโน homocysteine ที่ใช้สร้างกลูตาไทโอนไม่เพียงพอ เซลล์ต้องการ homocysteine เพิ่มมากขึ้น จึงต้องสลาย s-adenosylmethionine (SAM) ที่สร้างมาจากกรดอะมิโน methionine มาเป็น homocysteine แทน และในขณะเดียวกันก็ไม่มี homocysteine เหลือพอที่จะเปลี่ยนกลับไปเป็นกรดอะมิโน methionine ส่งผลต่อปริมาณ SAM ที่จะไปใช้ในกระบวนการ DNA methylation

ปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย ซึ่งความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA lesions) โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง CpG dinucleotide จะรบกวนการทำหน้าที่เป็นสับสเตรต (substrate) ของดีเอ็นเอสำหรับเอนไซม์ DNMT มีผลให้เกิด DNA methylation น้อยลง หรือเกิด global hypomethylation (15) ยกตัวอย่างเช่น 8-OHdG ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดซ์เบสกวีนีน โดย ROS ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด แม้จะเกิดอย่างไม่จำเพาะเจาะจง แต่ก็อาจเกิดขึ้นได้ในบริเวณลำดับเบสที่เป็น CpG dinucleotide ทำให้ไปยับยั้ง

methylation ของเบส cytosine ที่อยู่ติดกับเบส guanine ตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น โดยจะไปขัดขวาง การเข้าจับของ DNMT (13, 14) นอกจากนี้ 8-OHdG แล้ว O^6 -methylguanine ก็เป็น DNA damage product อีกชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากผลของการออกซิไดซ์ของ ROS ซึ่งสามารถขัดขวาง การเข้าจับของ DNMT ได้เช่นกัน (60, 61) หาก 8-OHdG ไม่ได้รับการซ่อมแซมที่เหมาะสม จะทำ ให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ G-T transversion ได้ ซึ่งหากเกิดที่บริเวณ CpG dinucleotide จะทำให้ มีปริมาณ CpG dinucleotide ลดลง ส่งผลให้เกิดการลดลงของ DNA methylation ได้ (62) นอกจากนี้ oxidative stress ยังอาจทำให้น้ำตาลดีออกซีไรโบสที่เป็นแกนกลางของสายดีเอ็นเอถูก ทำลายจนขาดออกจากกันได้ (double strand break) โดยพบว่า การขาดออกจากกันของสายดี เอ็นเออาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ DNA methylation ได้ (63) การศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าความเสียหายของดีเอ็นเอจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน มีผลต่อแบบรูปแบบ DNA methylation ซึ่งนำมาสู่การแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ และอาจส่งเสริมการเกิดมะเร็งได้ใน ที่สุด



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในประเทศไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผลพยาธิวิทยาเป็น Superficial Bladder Cancer

ประชากรตัวอย่าง (Sample population)

กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria) สำหรับกลุ่มควบคุม

1. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผลพยาธิวิทยาเป็น superficial transitional cell carcinoma

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) สำหรับกลุ่มทดลอง

1. เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดลุกลาม (muscle invasive)
2. มีความผิดปกติอื่นๆในระบบทางเดินปัสสาวะนอกเหนือจากเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น โรคเนื้องอกในกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น
3. มีความผิดปกติร้ายแรงหรือเป็นโรคเรื้อรังในอวัยวะอื่นๆ

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria) สำหรับกลุ่มคนปกติ

1. กลุ่มคนปกติจะต้องมีอายุและเพศที่ตรงกับกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มคนปกติจะต้องได้รับการตรวจสุขภาพประจำปีมีสุขภาพแข็งแรงและผลของการตรวจสุขภาพอยู่ในเกณฑ์ปกติ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) สำหรับกลุ่มคนปกติ

1. มีโรคมะเร็งที่ระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งต่อมลูกหมาก (ในเพศชาย) และมะเร็งปากมดลูก (ในเพศหญิง) เป็นต้น โดยเก็บข้อมูลจากการสัมภาษณ์โดยตรงกับอาสาสมัครและผลการตรวจสุขภาพประจำปี

2. การทำงานของไตผิดปกติ โดยพิจารณาจากการมีระดับของ serum creatinine > 1.4 mg% ในเพศชาย และ > 1.2 mg% ในเพศหญิง

ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

คำนวณขนาดประชากรตัวอย่าง 2 กลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน

1. ต้องการศึกษาระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับคนปกติ จากรายงานเดิมพบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 44 คน มีระดับสาร total antioxidant status (TAS) เฉลี่ย 1.2 ± 0.2 mM ส่วนกลุ่มคนปกติ 29 คน เป็น 1.4 ± 0.2 (mM ascorbate equivalence) mM (4)

$$\begin{aligned} \text{กำหนด } \alpha &= 0.05 \\ \beta &= 0.10 \\ Z_{\alpha/2} &= Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)} \\ Z_{\beta} &= Z_{0.10} = 1.28 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{สูตร } n/\text{group} &= 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / (X_1 - X_2)^2 \\ X_1 &= \text{ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1} = 1.2 \\ X_2 &= \text{ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2} = 1.4 \\ \sigma^2 &= \text{Pool variance} \\ &= \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \\ &= 0.04 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n/\text{group} &= 2(1.96 + 1.28)^2 (0.04) / (1.2 - 1.4)^2 \\ &= 21 \end{aligned}$$

จะต้องศึกษาในกลุ่มประชากรตัวอย่างกลุ่มละ 21 ราย

2. การศึกษาระดับ DNA methylation ของ LINE1 ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับคนปกติ จากการศึกษานำร่องพบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 5 ราย ระดับ methylation เฉลี่ยเท่ากับ 39 ± 1 % ส่วนกลุ่มคนปกติจำนวน 5 ราย เท่ากับ 37 ± 5 %

$$\begin{aligned} \bar{X}_1 &= \text{ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1} = 39 \\ \bar{X}_2 &= \text{ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2} = 37 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sigma^2 &= \text{Pool variance} \\ &= \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\end{aligned}$$

$$= 13$$

$$n/\text{group} = 2(1.96+1.28)^2(13)/(39-37)^2$$

$$= 69$$

จะต้องศึกษาในกลุ่มประชากรตัวอย่าง กลุ่มละ 69 ราย

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการตอบคำถามการวิจัยให้ได้ทั้ง 2 ข้อ จึงต้อง

รวบรวมประชากรตัวอย่างอย่างน้อย กลุ่มละ 69 ราย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	HVE-25, Dublin, Ireland
2) เครื่องชั่ง	SARTORIUS, Gottingen, Germany
3) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
4) Autopipette 10, 20, 100, 200, 1000 μ l และ tips	BIO-RAD, California, USA
5) ตู้บ่ม 37°C	ESCO, Singapore
6) ตู้อบ (Hot air oven)	MEMMERT, Schwabach, Germany
7) Centrifuge tubes 15, 50 ml	CORNING, New York, USA
8) Glassware	-
9) Low speed centrifuge	KOKUSAN, Japan
10) Microtube 250 μ l, 1 ml และ 1.5 ml	Corning, New York, USA
11) Microcentrifuge	Spectrafuge, LABNET, USA
12) Freezer (-80°C)	-
13) Spectrophotometer	Thermo Scientific, Ohio, USA
14) PCR machine	BIO-RAD, California, USA

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
15) Transsonic TP 690 16) Vortex mixer 17) Water baths 18) Microwave 19) Heat block 20) Ice maker 21) Electrophoresis power supply 22) Horizontal electrophoresis system 23) High speed centrifuge 24) Digital timer 25) Cuvettes (plastic and quartz) 26) Distilled water maker	Elma, Germany VORTEX-2 GENIE, USA GFL, Burgwedel, Germany - Techne, New Jersey, USA - BIO-RAD, California, USA BIO-RAD, California, USA SPECTRAFUGE, Utha, USA - PERKIN ELMER, Massachusetts, USA -
สารเคมี (Chemical substance)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
1) Ethanol 2) Isopropanol 3) Dinitrophenylhydrazine (DNPH) 4) Ethyl acetate 5) Guanidine hydrochloride (GdmCl) 6) Hydrochloric acid 7) Potassium phosphate, monobasic 8) Sodium chloride 9) Sodium phosphate, dibasic 10) Trichloroacetic acid 11) RNA stabilizer 12) Tirs base 13) Sodium hydroxide 14) Boric acid 15) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	MERCK, Darmstadt, Germany MERCK, Darmstadt, Germany Riedel-de Haën, Hannover, Germany BDH, England USB corporation, Ohio, USA BDH, England BAKER, New Jersey, USA USB corporation, Ohio, USA BAKER, New Jersey, USA BDH, England QIAGEN, Hilden, Germany USB corporation, Ohio, USA BDH, England SIGMA, Steinheim, Germany

เครื่องมือ (Equipments)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)
16) Ammonium acetate	-
17) Sodium metabisulfate	SIGMA, Steinheim, Germany
18) 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)	SIGMA, Steinheim, Germany
19) Hydroquinone	SIGMA, Steinheim, Germany
20) Glycogen	SIGMA, Steinheim, Germany
21) Ammonium persulfate (APS)	SIGMA, Steinheim, Germany
22) Tetramethylethylenediamine (TEMED)	SIGMA, Steinheim, Germany
23) 40% acrylamide/Bis solution 19:1	BIO-RAD, California, USA
24) SyBr GreenI	
25) Restriction enzyme TasI และ TaqI	MBI Fermentas, Glen Burnie, MD
26) Wizard DNA clean-up system	Promega, Wiscosin, USA
27) High pure PCR template preparation kit	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
28) 25 bp DNA step ladder	Promega, Wiscosin, USA
29) Taq DNA polymerase	QIAGEN, Hilden, Germany
30) dNTP mix, PCR grade	QIAGEN, Hilden, Germany

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การเก็บสารตัวอย่าง (Specimen collection)

1.1. การเก็บปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า (first morning urine)

วิธีการเก็บ คือ เก็บปัสสาวะในตอนเช้า โดยให้ปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อนแล้วเก็บปัสสาวะช่วงกลางใสภาชนะปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ ตัวอย่างปัสสาวะที่ได้นำมาปั่น 4000 rpm นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนใส (supernate) และส่วนที่เป็นตะกอน (cell pellet) เก็บทั้งสองส่วนที่ -80°C ก่อนการวิเคราะห์

1.2. การเก็บเลือด (Heparinized blood)

เจาะเลือด จากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนด้วยชุดอุปกรณ์เจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่าง plasma โดยการปั่นที่ 3000

rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ plasma เก็บที่ -20°C ก่อนการวิเคราะห์ ส่วน buffy coat เก็บที่ 4°C รอการสกัดดีเอ็นเอ

1.3. การเก็บเนื้อเยื่อ (Biopsy)

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

2. วิธีวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

2.1. การตรวจระดับ protein carbonyl ในพลาสมา โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay (64)

หลักการคือ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ทำปฏิกิริยากับหมู่ carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) บนหมู่แขนงข้าง (side chain) ของโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร คือ 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone จะเห็นเป็นตะกอนสีเหลืองหรือสีแดง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงหลักการวัด protein carbonyl โดยวิธี spectrophotometric DNPH assay โดยยกตัวอย่างการถูกออกซิไดซ์ที่กรดอะมิโน proline ของโปรตีน เมื่อ proline ถูกออกซิไดซ์เป็น 2-pyrrolidone ซึ่งมีหมู่ carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) จะทำปฏิกิริยากับ DNPH ได้ผลิตภัณฑ์เป็น DNP hydrazone ที่สามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

วิธีทำคือ เจือจางพลาสมาด้วย phosphate buffer saline (PBS) 20 เท่า โดยดูดพลาสมา 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PBS อยู่ 570 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบน 250 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม DNPH ลงไป 1 มิลลิลิตร

ส่วนหลอด blank ของแต่ละตัวอย่างพลาสมา เติม 2N HCl ลงไปแทน แล้วนำทุกหลอดไป incubated ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 45 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ เติม 20% TCA ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอด วางหลอดไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol : ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม guanidine hydrochloride (GdmCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายไม่หมด ให้นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ GdmCl ปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (OD_{test}) โดยใช้ blank ของแต่ละตัวอย่างปรับค่าการอ่านเริ่มต้นเป็นศูนย์ ปริมาณ protein carbonyl ในพลาสมาจะรายงานในหน่วยนาโนโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (nmol/mg protein)

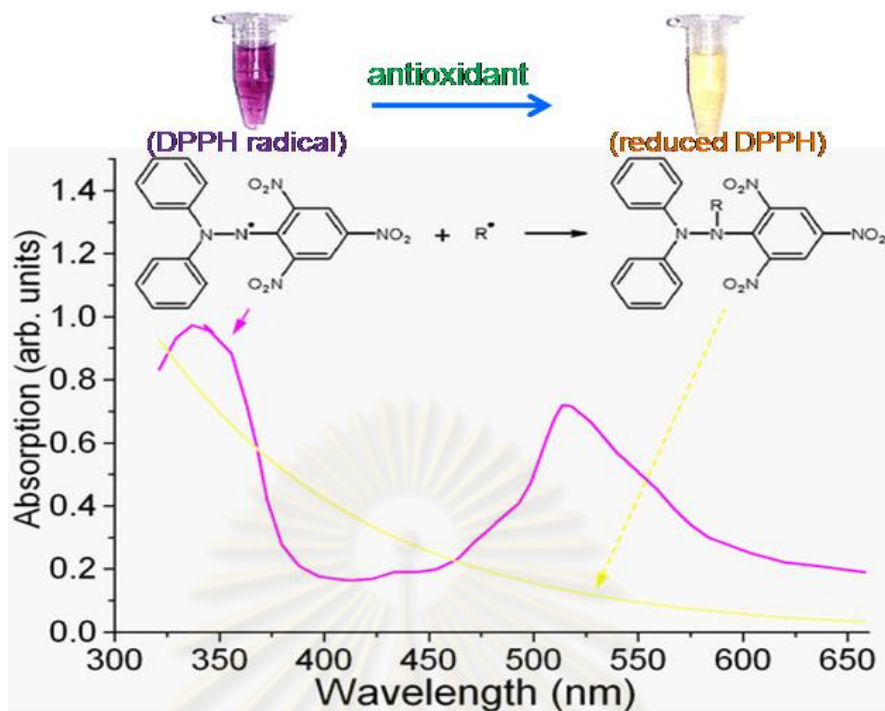
การคำนวณหาปริมาณ protein carbonyl

$$\text{Protein carbonyl (nmol/ml)} = OD_{test} \times 45.45$$

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg)} = \text{protein carbonyl (nmol/ml)} / \text{protein (mg/ml)}$$

2.2. การตรวจระดับ TAS ในปัสสาวะ โดยวิธี spectrophotometric DPPH assay (65)

หลักการคือ 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) เป็นสารอนุมูลอิสระที่ให้สีม่วงเมื่อละลายในเมทานอล ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอน (reduced DPPH) จากสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชั่น สีม่วงจะจางลง และการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรจะลดลง วัดปริมาณสารต้านออกซิเดชั่นในสารตัวอย่างจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงการดูดกลืนแสงของ DPPH ซึ่งดูดกลืนแสงได้สูงสุด ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แต่เมื่อ DPPH ถูกยับยั้งด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป reduced DPPH (สีเหลือง) ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรลดลง

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

การคำนวณหาปริมาณ TAS

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

2.3. การวิเคราะห์โปรตีนในพลาสมา โดยวิธี dye binding method (66)

หลักการคือ สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 dye ใน acidic solution (CBB reagent) ซึ่งปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด อยู่ที่ 465 นาโนเมตร โดยเป็นสารสีแดง แต่เมื่อจับกับโปรตีนจะเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เป็น 595 นาโนเมตร ให้สารละลายสีฟ้า

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

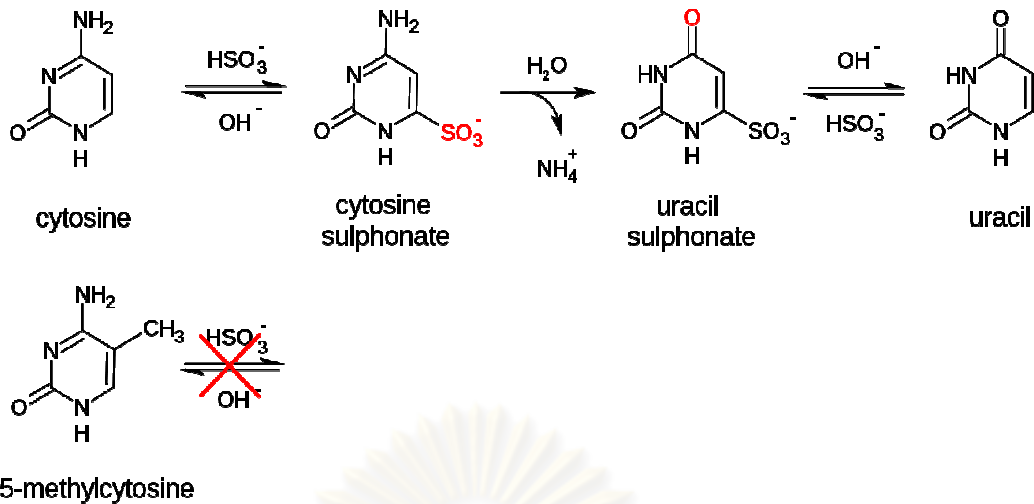
การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

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

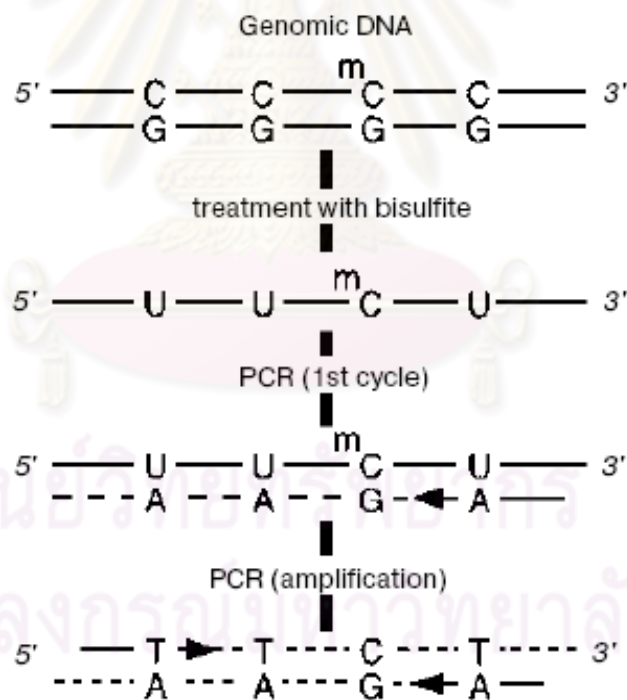
2.4. การตรวจระดับการเกิด methylation ของ LINE1 โดยวิธี combined bisulfite restriction analysis of LINE1 (COBRA-LINE1) (11)

หลักการคือ เมื่อนำ DNA ไป treat กับสารละลาย bisulfite (HSO_3^-) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการตั้งหมู่อะมิโน (NH_2) ออกจากเบส cytosine แต่จะไม่มีผลต่อเบส cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลหรือ 5-methylcytosine เมื่อ unmethylated cytosine เสียหมู่อะมิโนไปจะกลายเป็นเบส uracil ดังแสดงในภาพที่ 10 และเมื่อทำ PCR เบส uracil จะถูกเปลี่ยนเป็นเบส thymine ทำให้เหลือแต่เบส cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลเท่านั้น (ภาพที่ 11) จากขั้นตอนเบื้องต้นจะทำให้เกิดการคงไว้หรือสูญเสียตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme site) ดังนั้นเมื่อนำผลิตภัณฑ์จาก PCR (PCR product) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก็จะทำให้เกิดการตัดที่แตกต่างกันระหว่างบริเวณที่เกิดการเติมหมู่เมทิลและบริเวณที่ไม่ถูกเติม ได้ผลิตภัณฑ์ (digested fragment) ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ย้อมแถบดีเอ็นเอ และวัดระดับความเข้ม (intensity) ของ band ก็จะหาร้อยละการเกิดเมทิลได้ จากสูตร

$$\% \text{methylation} = 100 \times (\text{digested fragment}) / (\text{undigested} + \text{digested fragments})$$



ภาพที่ 10 แสดงกลไกการเกิด bisulfite conversion ซึ่งจะทำให้ unmethylated cytosine กลายเป็นเบส uracil แต่จะไม่มีผลต่อเบส cytosine ที่ถูกเติมหมู่เมทิลหรือ 5-methylcytosine



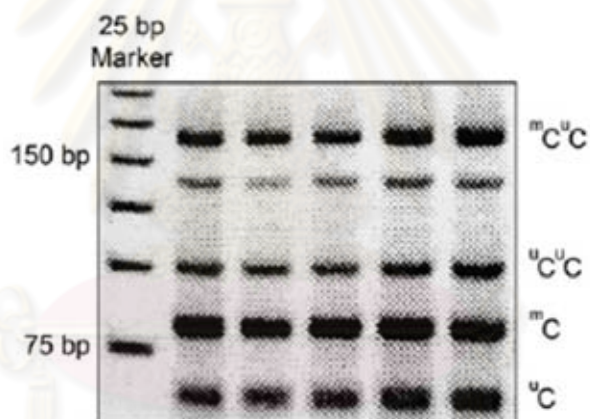
ภาพที่ 11 แสดงปฏิกิริยา PCR ของ DNA template ที่ถูก treat ด้วย bisulfite ซึ่งเบส uracil (U) จะถูกเปลี่ยนเป็นเบส thymine (T) ทำให้เหลือแต่เบส cytosine (C) ที่ถูกเติมหมู่เมทิลเท่านั้น

วิธีทำคือ สกัดแยก DNA โดยใช้ชุดสกัด high pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) ตรวจจสอบปริมาณ DNA ที่สกัดแยกได้

โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาหาอัตราส่วนของทั้งสองค่าเปรียบเทียบกับปริมาณค่าอัตราส่วนที่ได้ แล้วแบ่ง DNA 250 นาโนกรัม ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรจากนั้นนำ DNA มาทำ bisulfite treatment เริ่มต้นโดยเติม 2M NaOH 5.5 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA คลายเกลียวเป็นสายเดี่ยว แล้วเติม hydroquinone 30 ไมโครลิตร เขย่าทันทีที่จะเกิดสีเหลือง จากนั้นเติม sodium bisulfate 520 ไมโครลิตร incubate ที่ 50 °C ประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วจึง purified โดยใช้ Wizard DNA Clean-up System และละลาย DNA ด้วยน้ำอุ่น แล้ว desulfonated ด้วย 3M NaOH 5.5 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอน DNA ด้วยการเติม glycogen 1 ไมโครลิตร ตามด้วย ammonium acetate 17 ไมโครลิตร และ absolute isopropanol 220 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆด้วยมือ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อครบประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอน DNA นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที สุดท้ายละลายกลับด้วยน้ำ 20 ไมโครลิตร โดย bisulfite-treated DNA ที่ได้จะถูกเก็บที่ -20 °C จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE1 ด้วยเทคนิค COBRA LINE1 ขั้นตอน PCR จะใช้ forward primer คือ 5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3' และ reverse primer คือ 5'-RTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA-3' ซึ่งส่วนประกอบของสารเคมีในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 2 ภายใต้สภาวะ denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 15 นาที ตามด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C, 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 7 นาที แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ TspI และ TaqI ชนิดละ 2 U ใน 1xNEB3 buffer บ่มที่ 50 °C ซ้ำมคืน หรือประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโดย 8% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อม SYBR Green และตรวจวัดระดับความเข้ม (intensity) ของ band ที่ตำแหน่ง 160 bp (^mC^uC) 98 bp (^uC^uC) 80 bp (^mC) และ 62 bp (^uC) (ภาพที่ 12) ด้วยเครื่อง PhosphorImager โดยใช้ Image Quant software

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR (PCR protocol)

PCR mixture	Stock concentration	Working concentration	Final volume (μ l)
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4
10x PCR buffer	10x	1x	2.0
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0.8
Taq Polymerase	5 U/ μ l	1 U/ μ l	0.2
Forward primer	20 μ M	0.3 μ M	0.3
Reverse primer	20 μ M	0.3 μ M	0.3
dH ₂ O	-	-	14
DNA template	-	-	2.0



ภาพที่ 12 ตัวอย่างเจลแสดงผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส ย้อมแถบดีเอ็นเอ และวัดระดับความเข้ม ของ band ที่ตำแหน่ง 160 bp (^m¹³C¹³C) 98 bp (¹³C¹³C) 80 bp (^mC) และ 62 bp (¹³C)

การคำนวณหาระดับการเกิด methylation (56)

1. นำความเข้มของ band (%band) มาหารด้วยจำนวนเบส ดังต่อไปนี้

1.1. % band ที่ 160 หารด้วย 160 = A

1.2. % band ที่ 98 หารด้วย 94 = B

1.3. % band ที่ 80 หารด้วย 77 = C

1.4. % band ที่ 62 หารด้วย 60 = D

2. กำหนดให้ band ที่ 18 bp	= E = D-B
3. % methylation	= $\frac{mC}{{}^u C + mC}$ = $100X(C+A)/(C+A+A+B+D)$
4. % partial methylated loci (${}^m C^u C$)	= $\frac{mC^u C}{(mC^u C + {}^u C^u C + mC + {}^u C)}$ = $100X(A)/(((C-D+B)/2)+A+D)$
5. % hypomethylated loci (${}^u C^u C$)	= $\frac{{}^u C^u C}{(mC^u C + {}^u C^u C + mC + {}^u C)}$ = $100XB/(((C-E)/2)+A+E+B)$

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยจะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากอาสาสมัครทันทีที่พบว่ามีอาสาสมัครที่ตรงตามข้อกำหนดของการวิจัย โดยผู้ทำการวิจัยจะซักประวัติและเก็บข้อมูลทางคลินิกที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) หรือ interquartile range (IQR) ตามลำดับสำหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ความถี่และร้อยละสำหรับตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) โดยนำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

1. Two-samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
2. Correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (assumptions) ของ parametric tests ที่กล่าวมาข้างต้น จะใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ SPSS version 17.0 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

วิเคราะห์คุณสมบัติด้านการวินิจฉัยโรคโดย Receiver-operating characteristic (ROC) analysis ซึ่ง ROC curve เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลบวกจริง (true positive

rate หรือ sensitivity) ในแกน Y และอัตราผลบวกเท็จ (false positive rate หรือ 1-specificity) ในแกน X ดังแสดงในภาพที่ 13 ROC curve ใช้ในการประเมินว่าการทดสอบนั้นสามารถจำแนก ระหว่างผู้ป่วยกับคนปกติได้ดีเพียงใด ทั้งยังสามารถประเมินได้ว่าค่าอ้างอิง (cutoff) ที่แตกต่างกัน มีผลอย่างไรต่อความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) และเลือกค่า cutoff ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น diagnostic marker โดยค่า sensitive specificity และ accuracy มีความหมายดังต่อไปนี้

1. Sensitivity เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยที่จะบอกถึงสัดส่วนของผลบวกของการตรวจในผู้ป่วยที่เป็นโรคหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ถ้าผู้ป่วยมีโรคจริงโอกาสที่ผลตรวจจะให้ผลบวกร้อยละเท่าไร

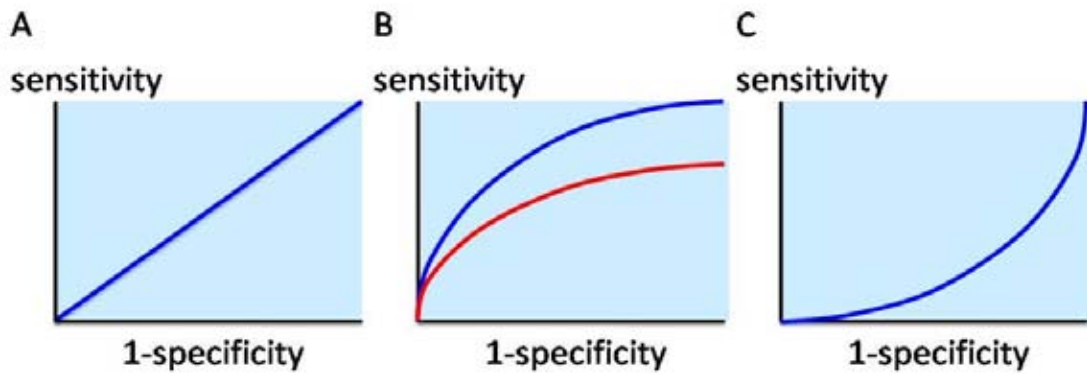
$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

2. Specificity เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยที่จะบอกถึงสัดส่วนของผลลบของการตรวจในคนปกติหรือในผู้ป่วยที่เป็นโรคอย่างอื่น หรือกล่าวอีกแบบหนึ่งคือ ถ้าคนที่ไม่ใช่โรคนั้นหรือคนปกติ มีโอกาสที่ผลตรวจจะให้ผลลบเป็นร้อยละเท่าไร

$$\text{Specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

3. Accuracy หมายถึงความแม่นยำของการตรวจ

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{number of true positives} + \text{number of true negatives}}{\text{number of TPs} + \text{FPs} + \text{FNs} + \text{TNs}}$$



ภาพที่ 13 กราฟ ROC เกิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราผลบวกจริง (sensitivity) ในแกน Y และอัตราผลบวกเท็จ (specificity) ในแกน X วิธีการตรวจที่ดีมีประโยชน์ ผลบวกจริงย่อมมากกว่าผลบวกเท็จ A: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงเท่ากับผลเท็จ ย่อมไม่ให้ประโยชน์กับผู้ป่วย B: การตรวจวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกจริงมากกว่าผลบวกเท็จ วิธีการใดที่ให้โค้ง ROC สูงกว่า (มีพื้นที่ใต้กราฟมากกว่า) ย่อมเป็นการวินิจฉัยที่ดีกว่า C: การวินิจฉัยนี้ให้ผลบวกเท็จมากกว่าผลบวกจริง วิธีการตรวจนี้จึงให้ผลเสียและเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้มีประชากรเข้าร่วมโครงการทั้งหมด 106 ราย แบ่งกลุ่มประชากรตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 61 รายและกลุ่มคนปกติซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 45 ราย ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer patients) ประกอบด้วยเพศชาย 52 ราย (85.25%) เพศหญิง 9 ราย (14.75%) อายุเฉลี่ยเท่ากับ 65.11 ± 12.16 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 42-91 ปี และกลุ่มคนปกติสุขภาพดี (healthy controls) เป็นเพศชาย 37 ราย (82.22%) เพศหญิง 8 ราย (17.77%) อายุเฉลี่ย 61.00 ± 13.25 ปี ช่วงอายุระหว่าง 30-81 ปี ค่าเฉลี่ยของดัชนีมวลกาย (Body Mass Index: BMI) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติเท่ากับ $22.24 \pm 3.71 \text{ kg/m}^2$ และ $23.15 \pm 2.45 \text{ kg/m}^2$ ตามลำดับ จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าอายุ ($P = 0.100$) เพศ ($P = 0.678$) และ BMI ($P = 0.188$) ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่3)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติโดยมี เพศ อายุและดัชนีมวลกาย

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

^a ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Chi-square test

^b ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Independent samples t-test

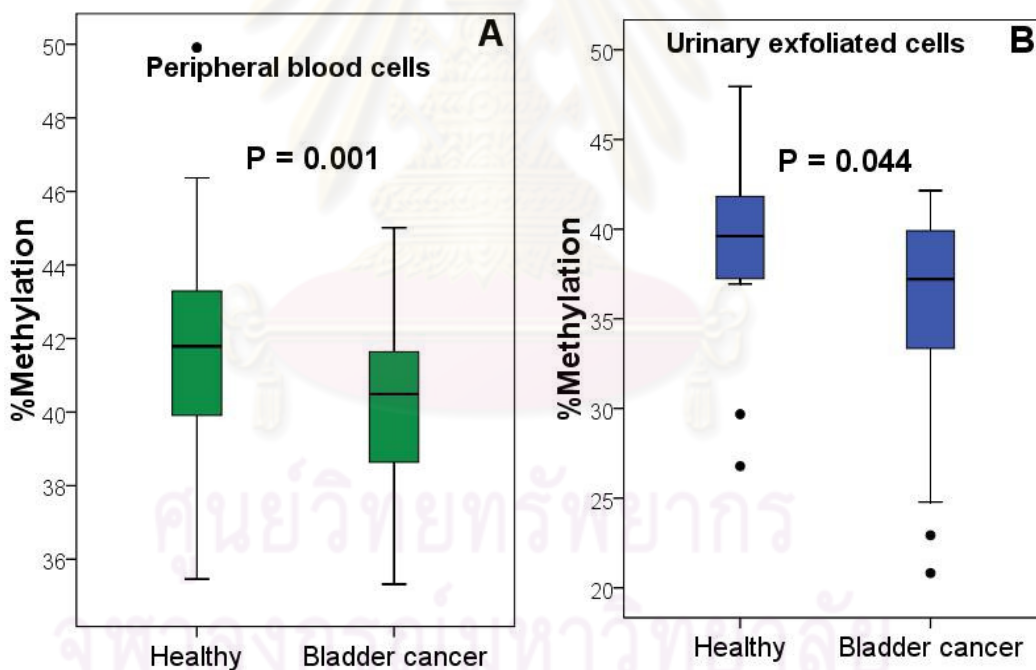
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลประวัติการสูบบุหรี่และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 61 ราย พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่มีประวัติการสูบบุหรี่มาก่อนมีถึง 54.24% ผู้ป่วยที่ผลพยาธิวิทยาเป็น low grade tumor มี 27 ราย คิดเป็น 45% และ high grade 33 ราย คิดเป็น 55% ส่วนประวัติการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซ้ำ (recurrence) พบว่าส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ตรวจพบเนื้องอกเป็นครั้งแรก (61.66%) ขณะที่ 38.33% เป็นผู้ป่วยที่เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซ้ำ ผู้ป่วย 35 ราย (59.32%) มีจำนวนก้อนเนื้องอก 1-3 ก้อน 6 ราย (10.17%) พบก้อนเนื้องอก 4-6 ก้อน และผู้ป่วยที่มีเนื้องอกจำนวนมากจนไม่สามารถนับได้มี 18 ราย (30.51%) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ใช้ในการศึกษา

ข้อมูลทางคลินิก	จำนวน (%)
การสูบบุหรี่	
- ไม่เคยสูบ	27 (45.76%)
- เคยสูบ	32 (54.24%)
Histological tumor grade	
- low	27 (45.00%)
- high	33 (55.00%)
Recurrence	
- primary	37 (61.66%)
- 1-3 recurrence	23 (38.33%)
จำนวนก้อนเนื้องอก	
- 1-3 ก้อน	35 (59.32%)
- 4-6 ก้อน	6 (10.17%)
- numerous	18 (30.51%)

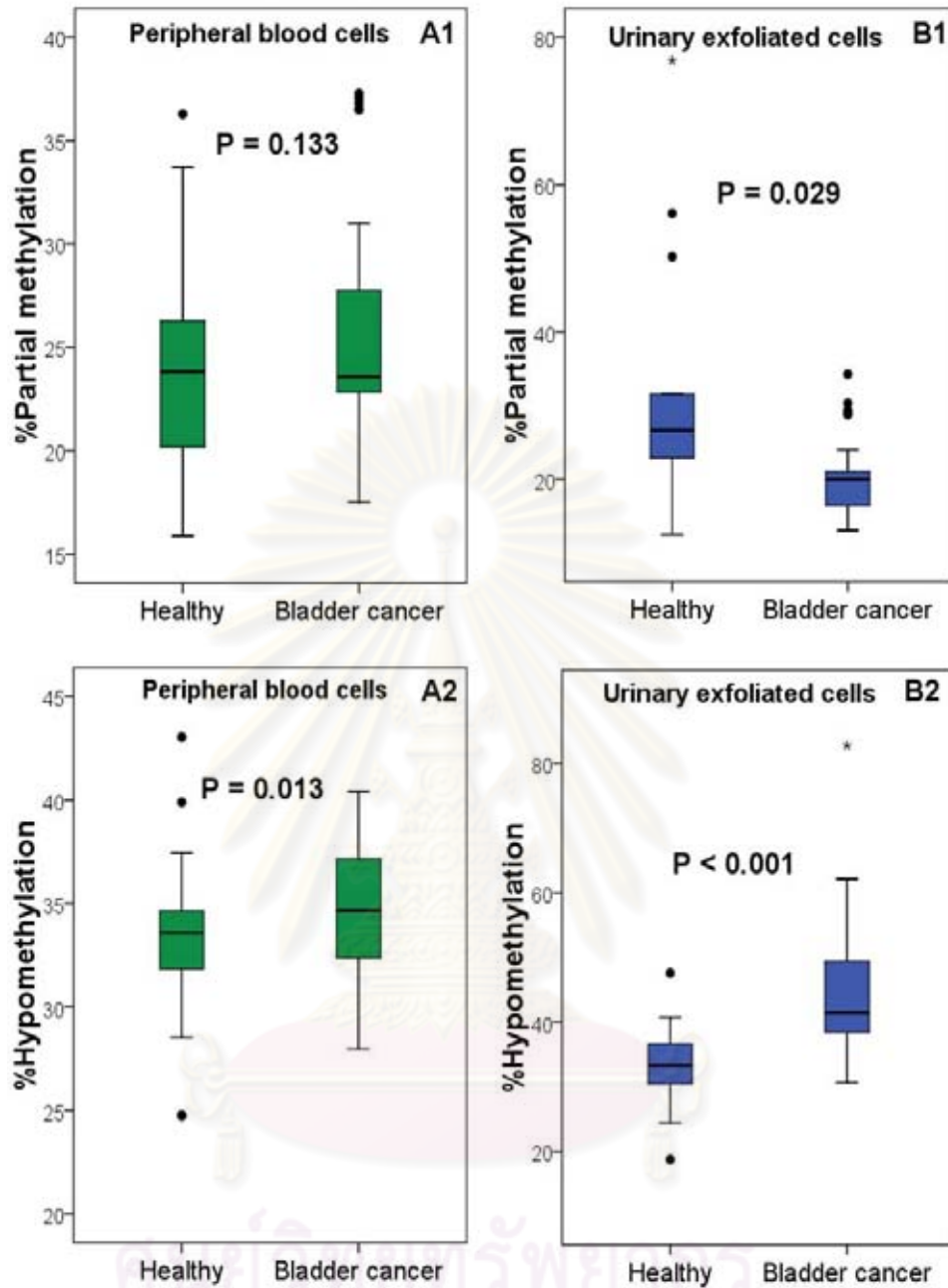
การศึกษาในระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ

ศึกษาระดับ LINE1 methylation ซึ่งจะบ่งบอกระดับการเกิด methylation ของทั้งจีโนม โดยการศึกษาในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการวิเคราะห์พบว่า ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (n = 60) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ (n = 45) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median(IQR): 40.49 (3.09) vs. 41.79 (3.55)) (P = 0.001) (ภาพที่14A) และจากการศึกษาในสารตัวอย่างที่เป็นเซลล์ในปัสสาวะผลการวิเคราะห์พบว่า ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (n=30) ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ (n=14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (median(IQR): 37.21 (7.33) vs. 39.61 (4.92)) (P = 0.044) (ภาพที่ 14B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับการเกิด LINE1 methylation ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 14 Box-Whisker plot แสดงระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: ระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ B: แสดงระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

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



ภาพที่ 15 Box-Whisker plot แสดงระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: แสดงระดับ partial methylation และ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ร้อยละการเกิด hypomethylation ของผู้ป่วย (n= 60) สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (n=45) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ partial methylation B: แสดงระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์ในปัสสาวะ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (n=30) มีร้อยละการเกิด partial methylation ต่ำกว่าแต่มีร้อยละการเกิด hypomethylation สูงกว่ากลุ่มคนปกติ (n=14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 15 ราย แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ร้อยละการเกิด LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เทียบกับในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยแต่ละราย

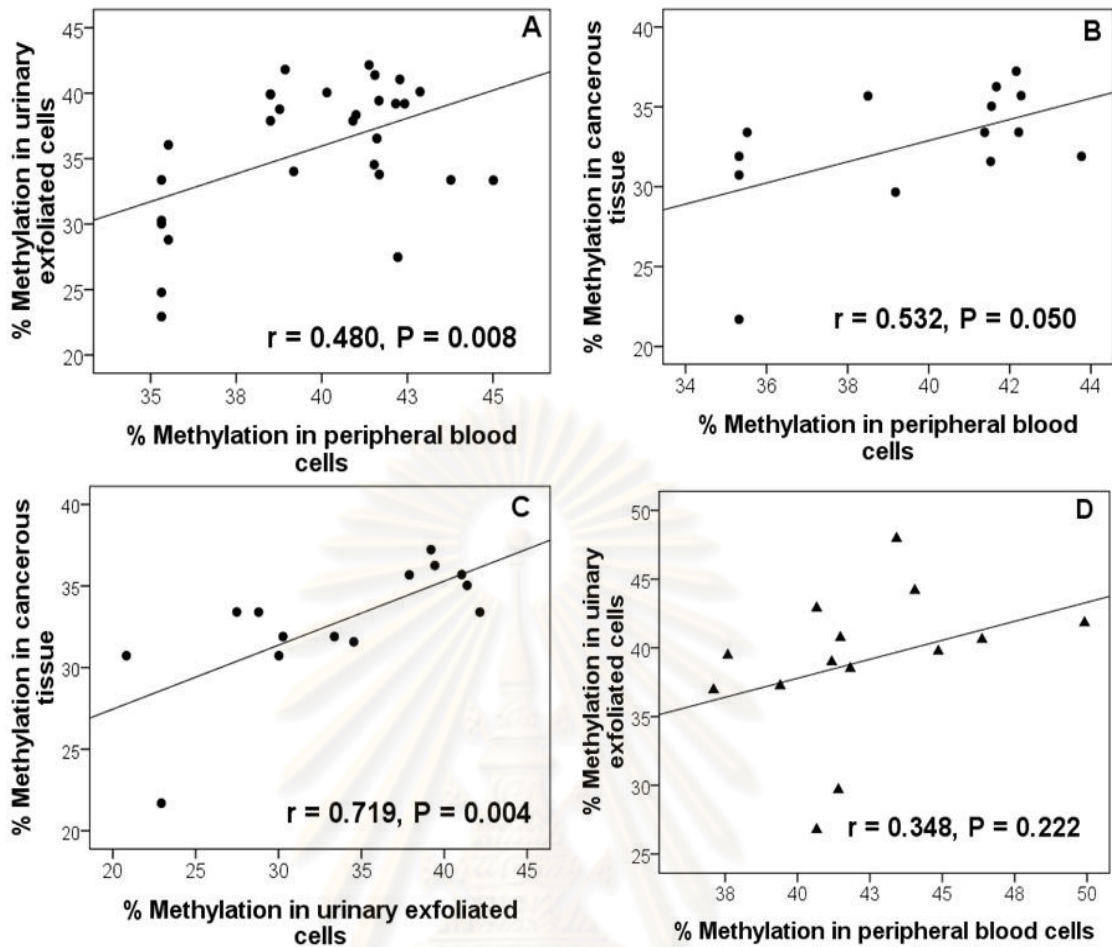
No.	Patient code	Histological grading	% Methylation		
			Cancerous tissues	Peripheral blood cells	Urinary exfoliated cells
1	NI01	H	33.40	41.39	42.15
2	NI03	H	30.73	nd	20.82
3	NI05	L	29.66	39.18	nd
4	NI07	L	31.58	41.53	24.54
5	NI11	H	33.41	42.22	27.48
6	NI12	H	36.26	41.67	39.43
7	NI23	H	21.69	35.33	22.93
8	NI25	H	31.90	43.77	33.37
9	NI37	H	35.04	41.55	41.38
10	NI48	L	30.73	35.32	30.02
11	NI51	H	35.68	38.50	37.89
12	NI52	H	31.90	35.30	30.27
13	NI53	L	37.23	42.16	39.20
14	NI59	L	35.70	42.28	41.05
15	NI60	L	33.39	35.51	28.80
median			33.40	41.53	33.37
IQR			3.95	6.77	12.10

nd: no data

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์ชนิดต่างๆ ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยใช้ Pearson's correlation test พบว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.480$, $P = 0.008$) (ภาพที่ 16A) และพบความสัมพันธ์เชิงบวกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งเช่นเดียวกัน ($r = 0.719$, $P = 0.004$) (ภาพที่ 16C) และยังพบแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งและของเซลล์เม็ดเลือดขาว ($r = 0.532$, $P = 0.050$) (ภาพที่ 16B) ดังนั้นในการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในสารตัวอย่างต่างชนิดกัน โดยเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกทั้งหมด นั่นคือการตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ น่าจะใช้เป็นตัวแทนหรือตัวบ่งชี้ระดับ LINE1 methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งได้ ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะน่าจะเป็นตัวแทนหรือบ่งชี้การเป็นมะเร็งที่ดีกว่า LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

นอกจากนี้ได้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติด้วย แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติ ($r = 0.348$, $P = 0.222$) (ภาพที่ 16D)



ภาพที่ 16 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์แต่ละชนิดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (A-C) และคนปกติ (D) A: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ B: แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็ง C: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ D: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติ

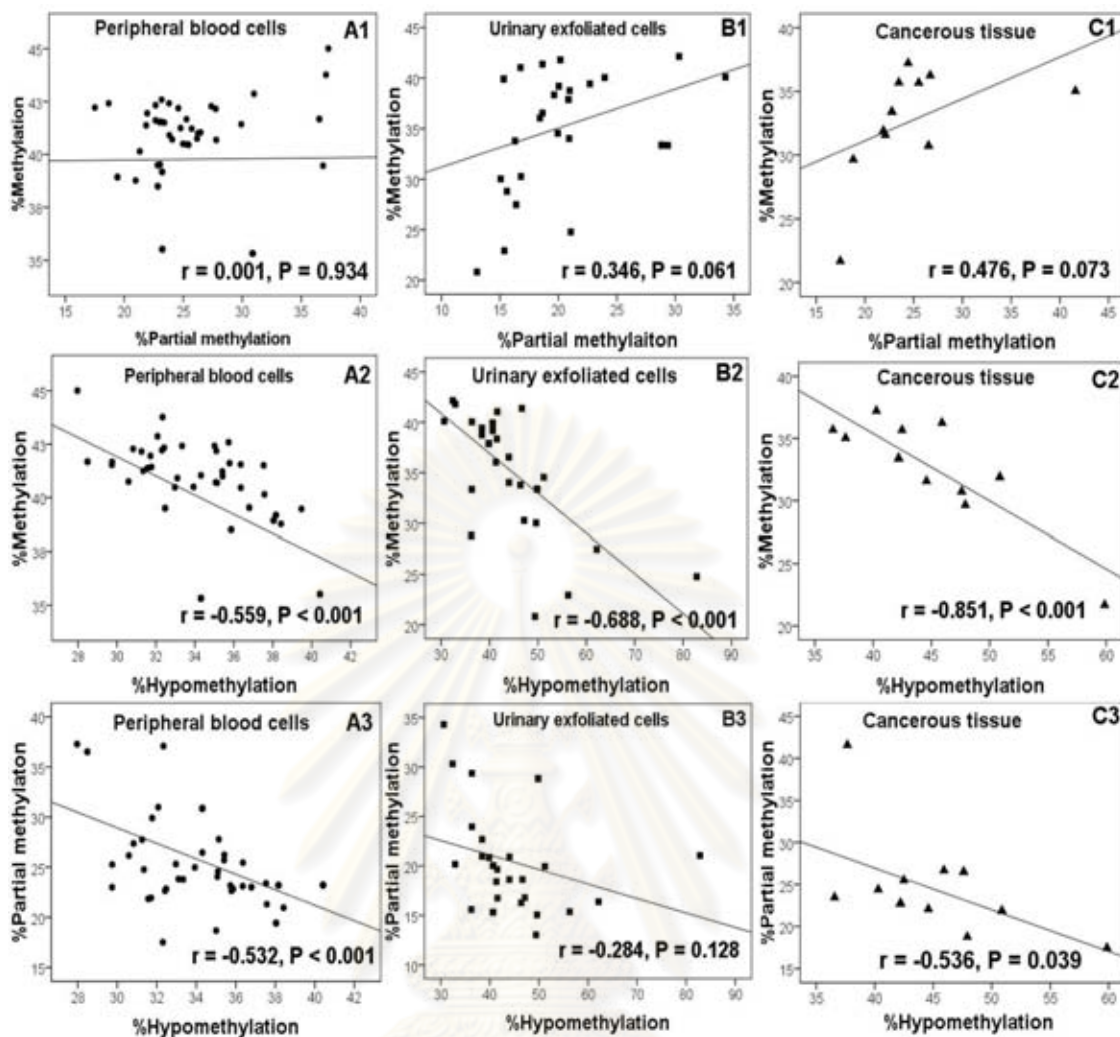
ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation (overall methylation) ระดับ partial methylation (partially methylated form หรือ ${}^mC^uC$) และระดับ hypomethylation (hypomethylated forms หรือ ${}^uC^uC$) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แสดงในตารางที่ 6 โดยในเซลล์เม็ดเลือดขาว พบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation ($r = -0.559$, $P < 0.001$) (ภาพที่ 17 A2) และความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง

ระดับ partial methylation และ hypomethylation ($r = -0.532, P < 0.001$) (ภาพที่ 17 A3) สำหรับเซลล์ในปัสสาวะพบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation ($r = -0.688, P < 0.001$) (ภาพที่ 17 B2) ส่วนเนื้อเยื่อมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะพบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation ($r = -0.851, P < 0.001$) (ภาพที่ 17 C2) และ ความสัมพันธ์เชิงลบ ระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation ($r = -0.536, P = 0.039$) (ภาพที่ 17 C3) แต่จากศึกษาครั้งนี้ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation และ partial methylation ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 17 A1) เซลล์ในปัสสาวะ (ภาพที่ 17 B1) และเนื้อเยื่อมะเร็ง (ภาพที่ 17 C1)

ตารางที่ 6 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation (overall methylation) ระดับ partial methylation (partial methylated form) และระดับ hypomethylation (hypomethylated form) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ($n=60$) เซลล์ในปัสสาวะ ($n=30$) และเนื้อเยื่อมะเร็ง ($n=15$) ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

sample	Level (%)	Methylation	Partial methylation
Peripheral blood cells (n = 60)	Partial methylation ${}^mC^uC$	$r = 0.011$ $P = 0.934$	
	Hypomethylation ${}^uC^uC$	$r = -0.559^{**}$ $P < 0.001$	$r = -0.532^{**}$ $P < 0.001$
Urinary exfoliated cells (n = 30)	Partial methylation ${}^mC^uC$	$r = 0.346$ $P = 0.061$	
	Hypomethylation ${}^uC^uC$	$r = -0.688^{**}$ $P < 0.001$	$r = -0.284$ $P = 0.128$
Cancerous tissue (n=15)	Partial methylation ${}^mC^uC$	$r = 0.476$ $P = 0.073$	
	Hypomethylation ${}^uC^uC$	$r = -0.851^{**}$ $P < 0.001$	$r = -0.536^*$ $P = 0.039$

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test



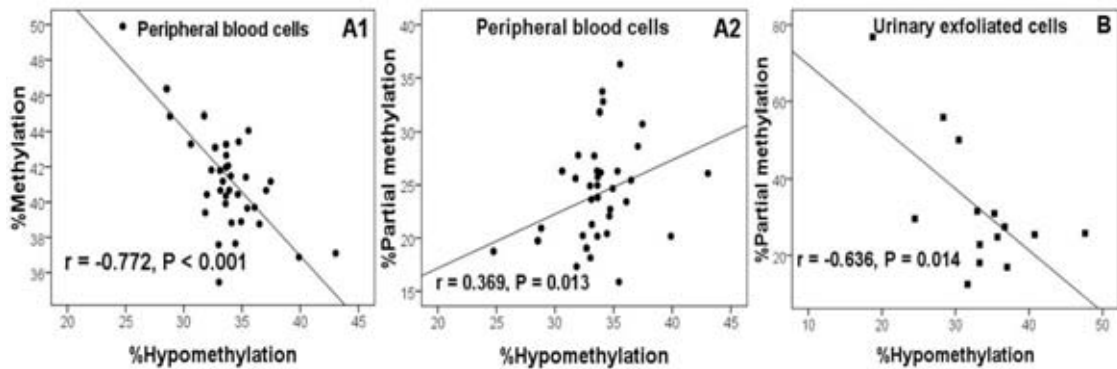
ภาพที่ 17 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation (${}^mC^C$) และระดับ hypomethylation (${}^uC^C$) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ A1: แสดง methylation ระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว A2: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation A3: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่าง ระดับ partial methylation และ hypomethylation B1: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์ในปัสสาวะ B2: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation C1: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเนื้อเยื่อมะเร็ง C2: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation C3: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติ ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation ($r = -0.772$, $P < 0.001$) (ภาพที่ 18 A1) และความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation ($r = 0.369$, $P = 0.013$) (ภาพที่ 18 A2) สำหรับเซลล์ในปัสสาวะพบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ partial methylation และ hypomethylation ($r = -0.636$, $P = 0.014$) (ภาพที่ 18 B) แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับ methylation และ partial methylation ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระดับ methylation (overall methylation) ระดับ partial methylation (partial methylated form) และระดับ hypomethylation (hypomethylated form) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติ

sample	Level (%)	Methylation	Partial methylation
Peripheral blood cells (n = 45)	Partial methylation ${}^m\text{C}^u\text{C}$	$r = 0.157$ $P = 0.302$	
	Hypomethylation ${}^u\text{C}^u\text{C}$	$r = -0.772^{**}$ $P < 0.001$	$r = 0.369^*$ $P = 0.013$
Urinary exfoliated cells (n = 14)	Partial methylation ${}^m\text{C}^u\text{C}$	$r = 0.148$ $P = 0.614$	
	Hypomethylation ${}^u\text{C}^u\text{C}$	$r = 0.120$ $P = 0.683$	$r = -0.636^*$ $P = 0.014$

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test

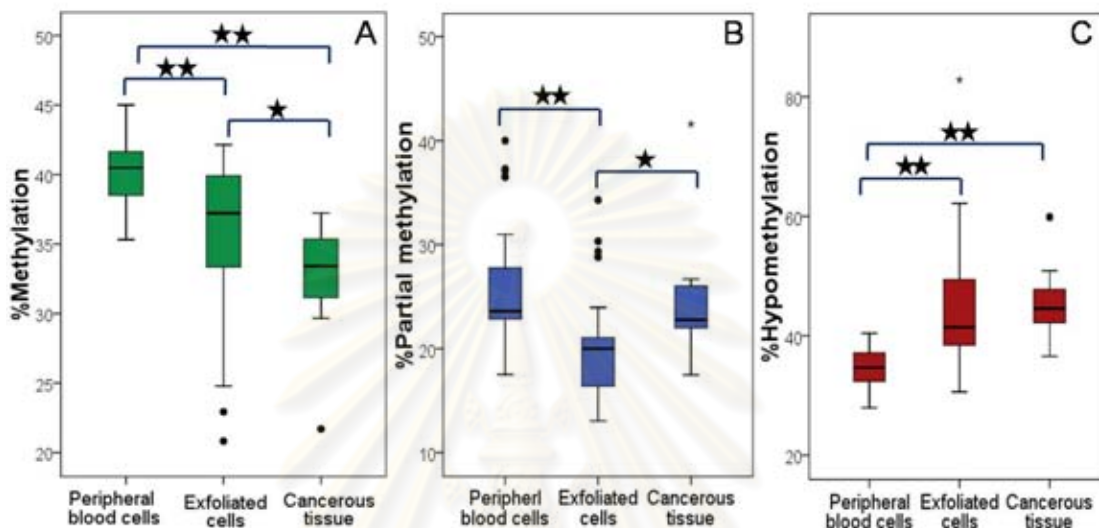


ภาพที่ 18 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของกลุ่มคนปกติ A: แสดง methylation ระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว A1: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง ระดับ methylation และ hypomethylation A2: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation B: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation ของเซลล์ในปัสสาวะ

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่า ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation เป็นความสัมพันธ์เชิงลบ ($r = -0.532$, $P < 0.001$) (ภาพที่ 17 A3) แต่ในกลุ่มคนปกติ เป็นความสัมพันธ์เชิงบวก ($r = 0.369$, $P = 0.013$) (ภาพที่ 18 A2) ซึ่ง แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับ partial methylation และ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติมีความแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะ และในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่าเซลล์ในปัสสาวะ ($P < 0.001$) และเนื้อเยื่อมะเร็ง ($P < 0.001$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะสูงกว่าในเนื้อเยื่อมะเร็ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.038$) (ภาพที่ 19A) ระดับ partial methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่าเซลล์ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และระดับ partial methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวต่ำกว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างระดับ partial methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็ง (ภาพที่ 19B) สำหรับระดับ hypomethylation พบความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระดับ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ กับเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็ง โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวมีระดับ hypomethylation ต่ำกว่าเซลล์ในปัสสาวะ ($P < 0.001$) และเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ($P < 0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างของเซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็ง (ภาพที่ 19C)



ภาพที่ 19 Box-Whisker plot แสดงระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ A: แสดงระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่าเซลล์ในปัสสาวะและในเนื้อเยื่อมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะสูงกว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน B: แสดงระดับ partial methylation ของเซลล์ในเม็ดเลือดขาวสูงกว่าเซลล์ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ partial methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวต่ำกว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ C: แสดงระดับ hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวต่ำกว่าและเซลล์ในปัสสาวะกับเซลล์ในเนื้อเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

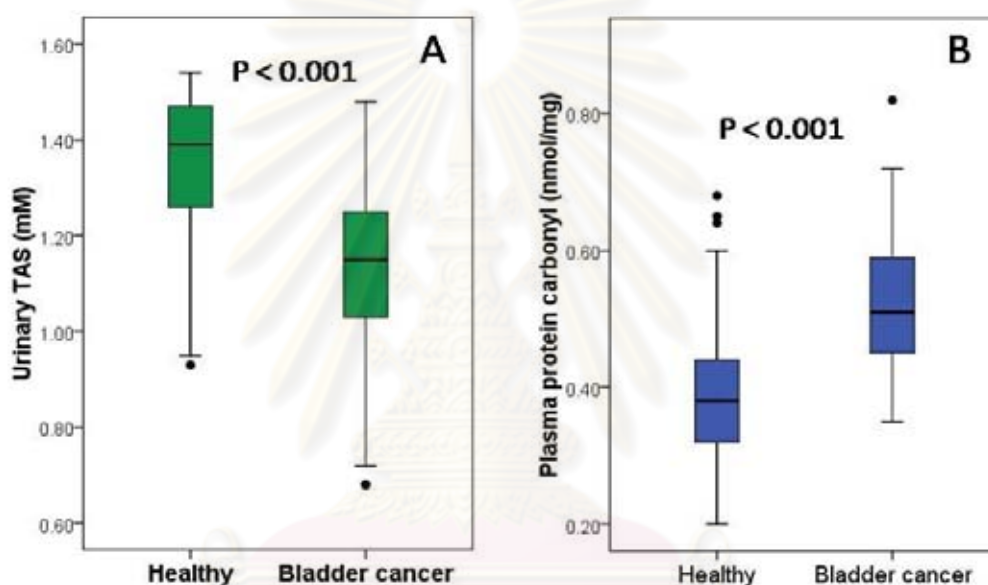
★ คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

★★ คือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

การศึกษากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

ศึกษากภาวะ oxidative stress จากระดับ total antioxidant status ในปัสสาวะ ซึ่งบ่งบอกระดับของสารต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และวัดระดับ protein carbonyl ในพลาสมาที่เป็นตัวบ่งชี้ระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับ TAS ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเท่ากับ 1.12 ± 0.20 mM ascorbate

equivalence และกลุ่มคนปกติเท่ากับ 1.33 ± 0.16 mM ascorbate equivalence ซึ่งระดับ TAS ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (ภาพที่ 20A) และจากการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมีค่าเท่ากับ 0.52 ± 0.11 nmol/mg และกลุ่มคนปกติเท่ากับ 0.39 ± 0.11 nmol/mg ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (ภาพที่ 20B) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่มีระดับสารอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าภาวะปกติ



ภาพที่ 20 Box-Whisker plot แสดงระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ A: แสดงระดับ TAS ในปัสสาวะของกลุ่มผู้ป่วยต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ B: แสดงระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยสูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยแยกพิจารณาเป็นคู่ตามตารางที่ 8 พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะ ($r = 0.618$, $P < 0.001$) (ภาพ 21A) และสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ($r = -0.327$,

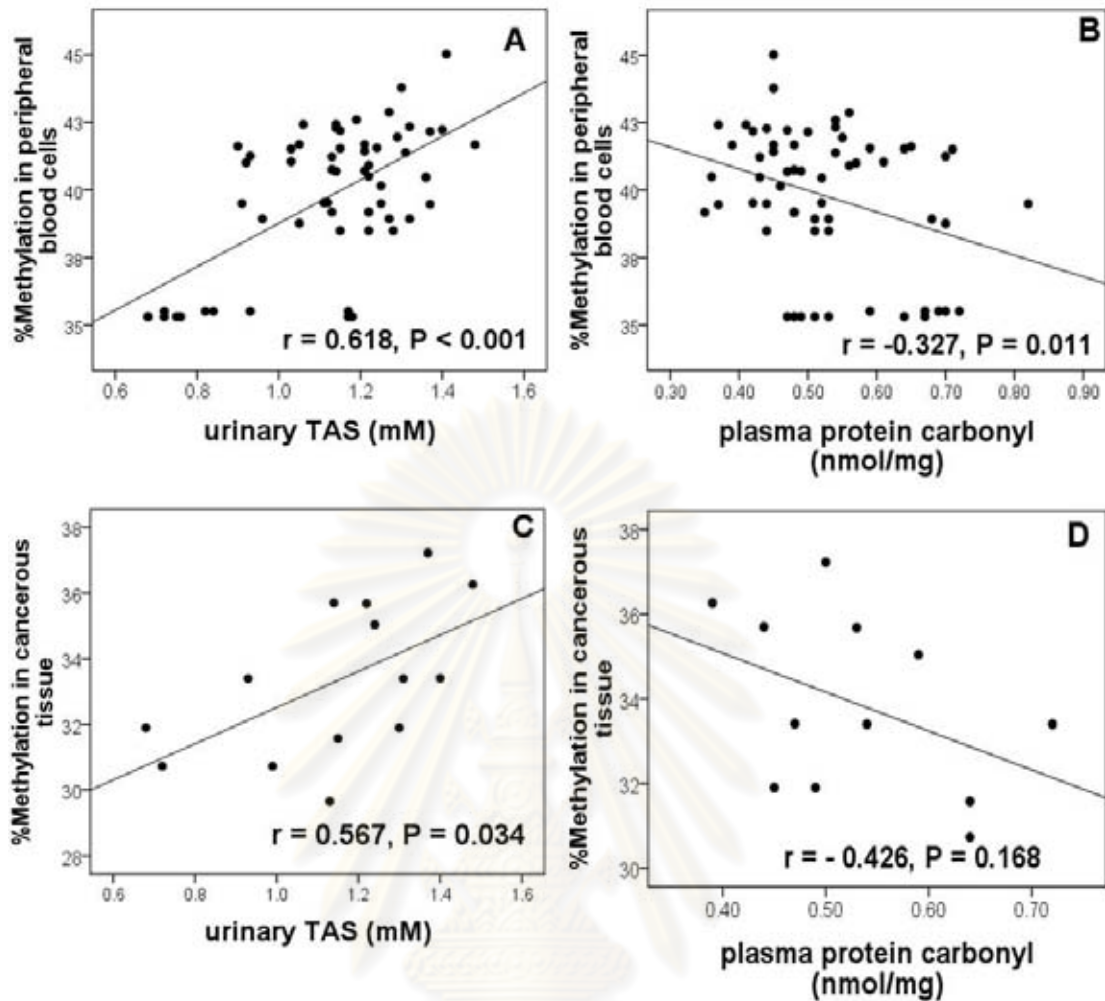
P = 0.011) (ภาพ 21B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับ methylation ของเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.567$, $P = 0.034$) (ภาพ 21C) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับ protein carbonyl (ภาพที่ 21D) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะกับระดับ TAS หรือ protein carbonyl (ตารางที่ 8)

จากการศึกษานี้แสดงว่าระดับ methylation ของเซลล์ในเม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์กับระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 21A และภาพที่ 21C) แต่เป็นความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ protein carbonyl (ภาพที่ 21B) นั่นคือภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงสัมพันธ์กับระดับ LINE1 methylation ต่ำ

ตารางที่ 8 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

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

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test



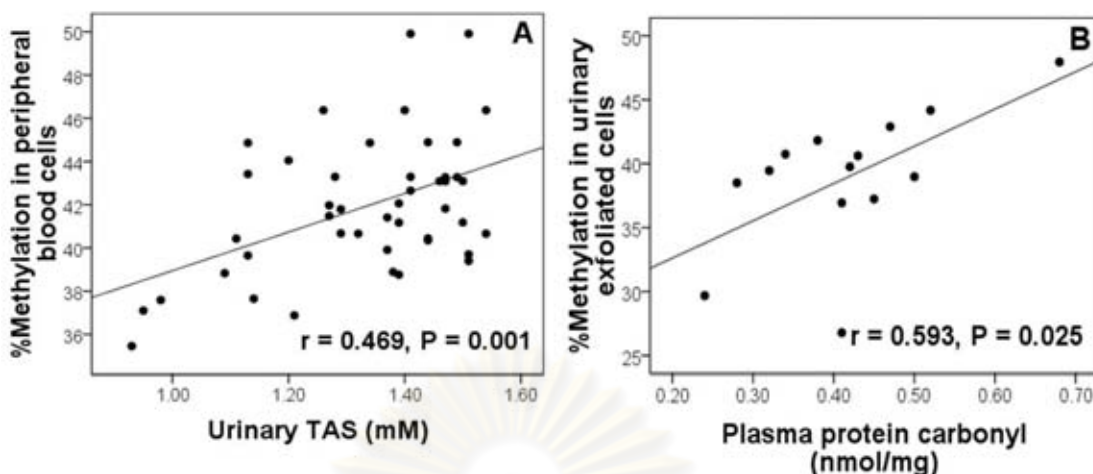
ภาพที่ 21 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ A: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับ TAS ในปัสสาวะ B: แสดงความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา C: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งและระดับ TAS D: แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ โดยแยกพิจารณาเป็นคู่ตามตารางที่ 9 พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TAS ในปัสสาวะ ($r = 0.469$, $P = 0.001$) (ภาพ 22A) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา นอกจากนี้พบว่าระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ($r = 0.593$, $P = 0.025$) (ภาพ 22B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับ TAS (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แสดงการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ

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

ค่า P value จากการวิเคราะห์สถิติโดยวิธี Pearson's correlation test



ภาพที่ 22 Scatter plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มคนปกติ A: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation เซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับ TAS ในปัสสาวะ B: แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะและระดับ protein carbonyl ในพลาสมา

การศึกษาค้นคว้าทางคลินิกในการวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (diagnostic values) ของการตรวจวัด LINE1 methylation และตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ receiver operating characteristic (ROC) curve เพื่อประเมินคุณค่าของการตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในเม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ สำหรับใช้ในการแยกแยะผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากคนปกติ พื้นที่ใต้กราฟของ ROC curve (area under curve (AUC)) เป็นค่าที่ใช้สำหรับบอกว่าการทดสอบ (test) ใดๆ มีประสิทธิภาพในการแยกแยะระหว่างกลุ่มคนเป็นโรค (disease) กับคนไม่เป็นโรค (non-disease) ได้ดีเพียงใด โดย $AUC = 0.5$ บ่งชี้ว่าการทดสอบนั้นๆ ไม่สามารถแยกแยะระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มที่ไม่เป็นโรคได้เลย ขณะที่ $AUC = 1$ บ่งชี้บอกว่าการทดสอบนั้นๆ สามารถใช้จำแนกกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มที่ไม่เป็นโรคได้อย่างสมบูรณ์แบบ (perfectly distinguishing) นอกจากนี้การนำการตรวจทางห้องปฏิบัติการไปใช้ในทางคลินิก จำเป็นต้องพิจารณาถึงความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ด้วย โดยการทดสอบควรมีค่า sensitivity และ specificity สูงที่สุด

ผลการวิเคราะห์ ROC curve และค่า AUC ของการตรวจวัดแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 10 พบว่าการตรวจวัดระดับ hypomethylation ($^{14}C^{15}C$) (%) ของเซลล์ในปัสสาวะ ให้ค่า

AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.848 (ภาพที่ 23C) มี sensitivity เท่ากับ 80.00% และระดับ specificity เท่ากับ 85.00% ในขณะที่การวัดระดับ LINE1 methylation แบบอื่นๆ ให้ค่า AUC ที่น้อยกว่า แสดงว่าการตรวจวัด hypomethylated form ($^{13}C^{13}C$) สามารถใช้ในการจำแนกผู้ป่วยมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะออกจากคนปกติได้ดีกว่าการตรวจวัด total และ partial methylation

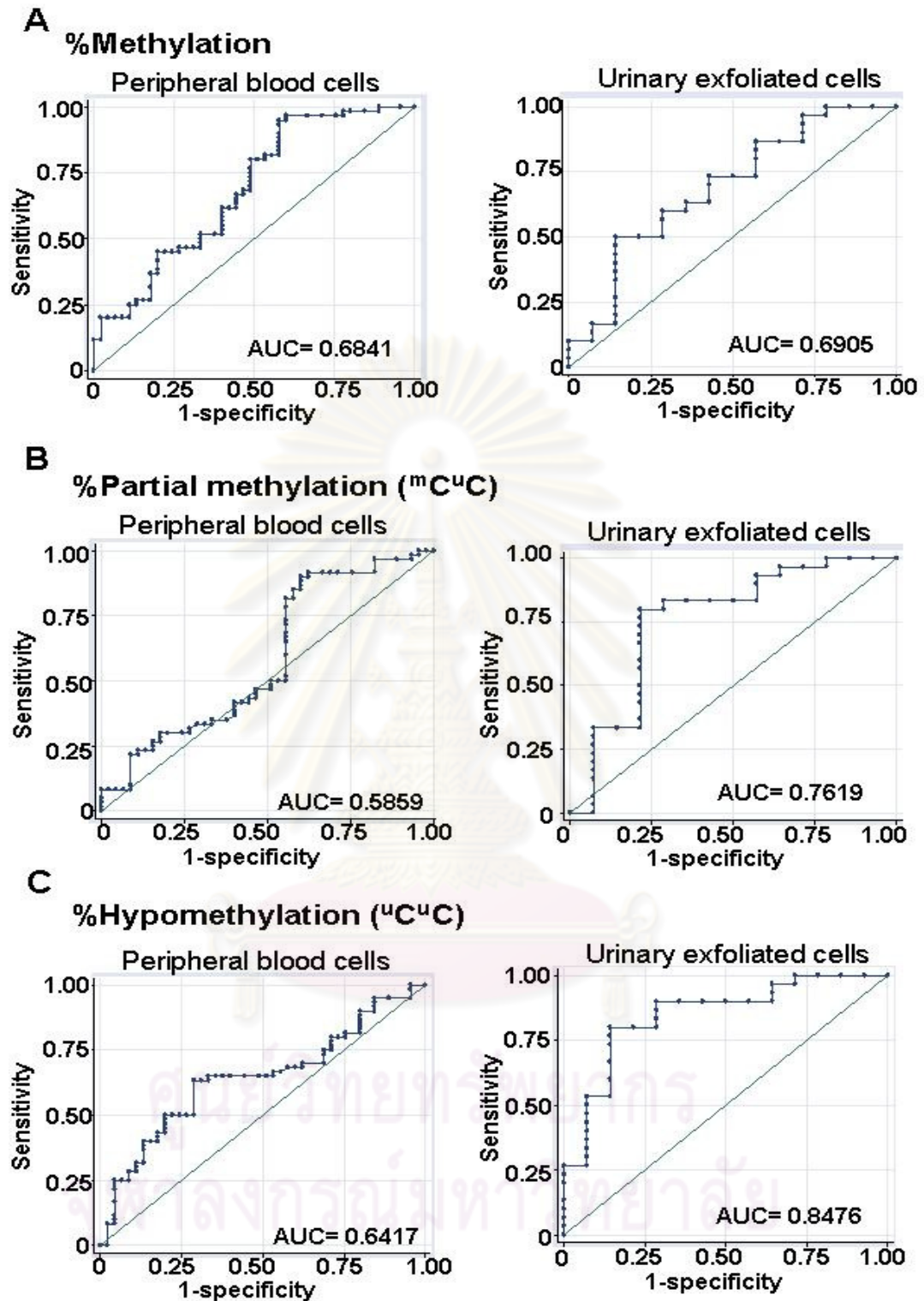
สำหรับการวิเคราะห์หาค่าทางการวินิจฉัยของตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน พบว่า protein carbonyl ในพลาสมา ให้ค่า AUC ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.819 (ภาพที่ 24B) มีค่า sensitivity เท่ากับ 81.97% และ specificity เท่ากับ 73.33% ขณะที่ AUC ของการตรวจวัด TAS ในปัสสาวะ เท่ากับ 0.800 (ภาพที่ 24A) sensitivity เท่ากับ 88.52% และ specificity เท่ากับ 60.00% (ตารางที่ 10)



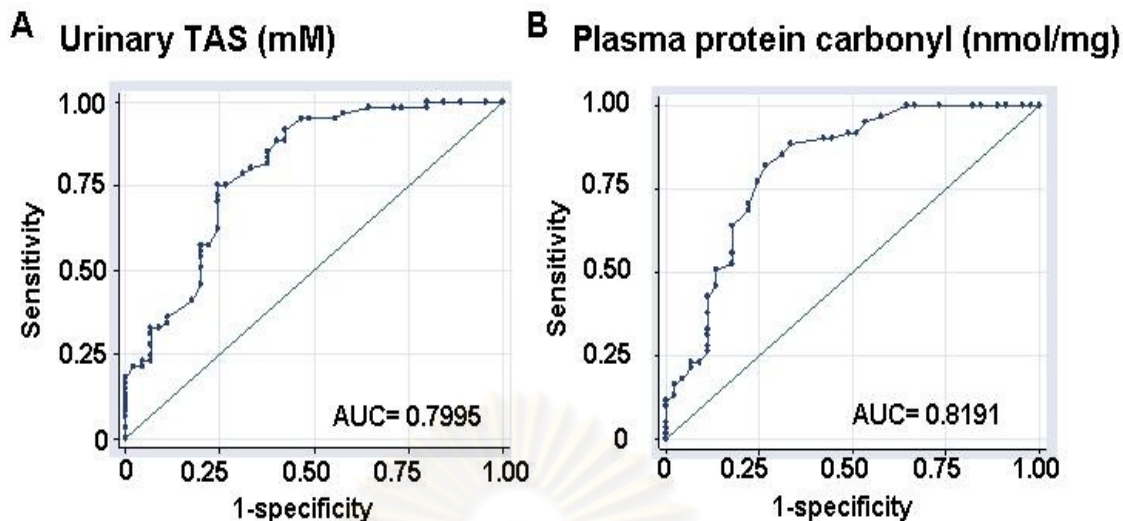
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงค่า area under ROC curve (AUC) ค่า sensitivity และ specificity ของการตรวจวัดระดับ methylation ระดับ partial methylation และ ระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ และการตรวจวัดระดับ TAS ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติ

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



ภาพที่ 23 แสดง ROC curve ของระดับ methylation ระดับ partial methylation และระดับ hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (n=105) และเซลล์ในปัสสาวะ (n = 44) A: ROC curve ของระดับ methylation B: ROC curve ของระดับ partial methylation C: ROC curve ของระดับ hypomethylation มีระดับ sensitivity และระดับ specificity ที่ดีกว่า %methylation



ภาพที่ 24 แสดง ROC curve ของระดับ urinary TAS และระดับ plasma protein carbonyl (nmol/mg) (n = 106) A: ROC curve ของระดับ urinary TAS (mM ascorbate equivalence) (n=106) B: ROC curve ของระดับ plasma protein carbonyl (nmol/mg) (n = 106)

เนื่องจากมีโอกาสน้อยที่วิธีการทดสอบใดหรือวิธีตรวจเดียวจะมีทั้ง sensitivity และ specificity สูง จึงอาจใช้วิธีทดสอบหรือการตรวจหลายอย่างร่วมกัน (test combination) เพื่อเพิ่มทั้งความไวและความจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้การตรวจร่วมกันแล้ว ถ้าตัดสินการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยระดับ hypomethylation ($^{13}C^{15}N$) ของเซลล์ในปัสสาวะหรือ protein carbonyl ในพลาสมาอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นผลบวก (%hypomethylation or plasma protein carbonyl Positive) จะทำให้เพิ่มความไวของการตรวจขึ้นเมื่อเทียบกับความไวของการตรวจและละอย่าง แต่ถ้าตัดสินมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อทั้งระดับ hypomethylation ($^{13}C^{15}N$) ของเซลล์ในปัสสาวะและ protein carbonyl ในพลาสมา ให้ผลเป็นบวกทั้งคู่ (%hypomethylation and plasma protein carbonyl Positive) ให้ความจำเพาะรวมกันถึง 100.00% โอกาสที่ผู้ป่วยมีผลบวกเท็จ (false positive) เป็น 0.00% หรือไม่มีเลย (ตารางที่ 11)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลการคำนวณค่า sensitivity และ specificity เมื่อมีการตรวจร่วมสองอย่างเพื่อวินิจฉัยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

Test	BCA	Healthy	Total
% Hypomethylation ($^{13}C^{15}C$)			
- Positive	24	2	26
- Negative	6	12	20
Plasma protein carbonyl (nmol/mg)			
- Positive	50	12	62
- Negative	11	30	41
% Hypomethylation or plasma protein carbonyl Positive			
- Positive	29	7	36
- Negative	1	7	8
% Hypomethylation and plasma protein carbonyl Positive			
- Positive	19	0	19
- Negative	11	14	25

Test	Sensitivity	Specificity
Single test		
%Hypomethylation ($^{13}C^{15}C$)	80.00	85.00
Plasma protein carbonyl (nmol/mg)	81.97	73.33
Combined test		
%Hypomethylation or plasma protein carbonyl Positive	96.66	50.00
%Hypomethylation and plasma protein carbonyl Positive	63.33	100.00

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชัน กับระดับ LINE1 methylation รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ผลการศึกษา พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 14A และ 14B) จากการศึกษาี้แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ LINE1 hypomethylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ และรูปแบบการเกิด LINE1 methylation ที่พบบ่อยในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ hypomethylated form หรือ unmethylated pattern หรือ ${}^u\text{C}^u\text{C}$ ซึ่งพบได้สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยกระเพาะปัสสาวะพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งต่ำกว่าระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะ และเซลล์เม็ดเลือดขาว ตามลำดับ (ภาพที่ 19A) ผลวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์จากแต่ละแหล่งมีระดับ LINE1 methylation แตกต่างกัน โดยในเนื้อเยื่อมะเร็งมีภาวะ LINE1 hypomethylation สูงสุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีปริมาณเซลล์มะเร็งมากที่สุด เซลล์ในปัสสาวะมีระดับ LINE1 hypomethylation ใกล้เคียงกับในเนื้อเยื่อมะเร็ง จึงน่าจะเป็นสารตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับตรวจวินิจฉัยมากกว่าเซลล์เซลล์เม็ดเลือดขาว

ระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ methylation ของเซลล์ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 16C) และยังพบแนวโน้มความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับ methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 16B) แสดงว่าการวัดระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะน่าจะสะท้อนถึงระดับ LINE1 methylation ในเนื้อเยื่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่า รูปแบบการเกิด LINE1 methylation แบบ partial methylation (${}^m\text{C}^u\text{C}$) และ hypomethylation (${}^u\text{C}^u\text{C}$) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ พบความสัมพันธ์เชิงลบ ระหว่าง partial methylation และ

hypomethylation ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (ภาพที่ 17 A3) ขณะที่เป็นการสัมพันธ์เชิงบวกในกลุ่มคนปกติ (ภาพที่ 18 A2)

ผลการศึกษาระดับ oxidative stress พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ protein carbonyl สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 20B) ขณะที่ระดับ total antioxidant status (4) ในปัสสาวะ ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 20A) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิด LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าระดับ methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 21A) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบ กับระดับ plasma protein carbonyl (ภาพที่ 21B) ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต่ำลงสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้น (ภาพที่ 21A และ 21B) การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

อภิปรายผลการวิจัย

เป็นที่ยอมรับกันว่าพบว่า global hypomethylation สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากการเกิด global hypomethylation ทำให้อัตราการเกิด mutation สูงขึ้นนำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม (50) หลายการศึกษารายงานการพบภาวะ global hypomethylation ในเซลล์มะเร็ง เช่นมะเร็งศีรษะและคอ (head and neck cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น (10, 11, 67-70) การเกิด LINE1 hypomethylation เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเหนือพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิด (11, 68, 71) รวมทั้งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็ง (9, 11) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (20, 72) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ผลที่สอดคล้องกันคือ พบว่าระดับ LINE1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะ ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือพบภาวะ LINE1 hypomethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แสดงว่าการใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในการวัดระดับ LINE1 methylation น่าจะใช้ตรวจสอบความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ แต่ผลที่ได้ยังไม่สามารถบ่งชี้การเป็นมะเร็งได้แม่นยำนัก เนื่องจากระดับ LINE1 methylation ที่วัดได้มีการกระจายเป็นช่วงกว้างและมีความ

แตกต่างกันมาก (wide ranges and varied levels) ซึ่งส่งผลต่อ specificity ของการตรวจวัดระดับ LINE1 methylation ทำให้มีระดับ specificity ต่ำ (10, 11, 67)

นอกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้วยังพบว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ตรวจสอบระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับ LINE1 ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ในปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวมีระดับ LINE1 methylation สูงกว่าเซลล์ในปัสสาวะ และเนื้อเยื่อมะเร็ง ตามลำดับ แสดงว่าระดับ LINE1 methylation มีความจำเพาะระหว่างเซลล์แต่ละชนิด โดยพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวมีระดับ LINE1 methylation สูงที่สุด และเนื้อเยื่อมะเร็งมีระดับ LINE1 methylation ต่ำที่สุด หรืออาจเป็นไปได้ว่าในเลือดมีเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะน้อยที่สุด จึงมีระดับ LINE1 methylation สูงสุด สำหรับระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะพบว่ามีความจำเพาะอยู่ตรงกลางระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็ง และพบว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์ในปัสสาวะมีช่วงที่กว้างมากที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อมะเร็ง ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะเป็นเพราะเซลล์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เก็บได้และนำมาสกัดดีเอ็นเออาจมีเซลล์หลายชนิดปนอยู่ด้วยกัน เช่น เซลล์เยื่อของกระเพาะปัสสาวะส่วนที่เป็นมะเร็ง (urothelial cancer cells) และเซลล์เยื่อทางเดินปัสสาวะในส่วนที่ไม่ได้เป็นมะเร็งแต่มีการอักเสบ เซลล์เม็ดเลือดขาวจากการอักเสบและติดเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mutirangura และคณะ ที่พบว่าระดับ LINE1 methylation มีความจำเพาะระหว่างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดที่มาจากอวัยวะที่แตกต่างกัน ซึ่งเนื้อเยื่อมะเร็งจะมีระดับ LINE1 methylation ต่ำกว่าเนื้อเยื่อปกติ (11)

Mutirangura และคณะ (56) เสนอว่าในเซลล์ที่มีระดับ LINE1 methylation ไม่แตกต่างกัน อาจมี LINE1 methylation pattern แตกต่างกันได้ ดังนั้นการวัดระดับ LINE1 methylation ในเชิงปริมาณอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นตัวชี้วัดความเสี่ยงของมะเร็งได้ ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากศึกษาระดับ LINE1 methylation แล้ว ยังได้ศึกษารูปแบบการเกิด LINE1 methylation จำนวน 2 รูปแบบ คือ partial methylation หรือ ${}^mC^uC$ และ hypomethylation หรือ ${}^uC^uC$ โดยเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติ พบว่า ผู้ป่วยมีรูปแบบการเกิด LINE1 methylation แบบ ${}^uC^uC$ ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในปัสสาวะสูงกว่าจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่านอกจากระดับ LINE1 methylation ที่ลดลงแล้ว รูปแบบ LINE1 hypomethylation ก็อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ ROC curve พบว่า hypomethylation หรือ ${}^uC^uC$ ของเซลล์ในปัสสาวะให้ค่า AUC ที่สูงที่สุด (cutoff: 38.43), sensitivity = 80.00%, specificity = 85.00% และ accuracy = 81.82%)

แสดงว่า LINE1 hypomethylated pattern อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ดีกว่าระดับ overall LINE1 methylation

มีงานวิจัยจำนวนมากพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง (6, 21) โดยภาวะเครียดจากออกซิเดชันเกิดเนื่องจากการสร้าง ROS ของเซลล์ในร่างกายเพิ่มขึ้นและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ ไขมันและโปรตีน เป็นต้น เมื่อสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ถูกทำลายจะทำให้สูญเสียหน้าที่และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาการบาดเจ็บของโปรตีนจากผลของ ROS หรือ protein oxidation เนื่องจากมีการศึกษาที่รายงานว่า oxidative damage ต่อโปรตีนมีความสำคัญมากกว่า oxidative damage ต่อไขมัน (21) เพราะเมื่อมีการบาดเจ็บของโปรตีนสะสมมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์สูญเสียการทำงาน ส่งผลให้เซลล์ทำงานผิดปกติจนทำให้เซลล์ตายในที่สุด (73) ซึ่งสารที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของโปรตีนจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ protein carbonyl (74-77) ซึ่งมีการศึกษาหลายงานวิจัยพบว่าระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease (AD)) (78-81) โรคเบาหวาน (diabetes) (82-84) โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease (IBD)) (85) โรคข้ออักเสบ (arthritis) (86, 87) และโรคตับอักเสบชนิด C (hepatitis C) (88) เป็นต้น อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด (89, 90) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับของ protein carbonyl สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (21) แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ ROS ในเลือดสูงกว่าคนปกติ นอกจากนี้ผลการศึกษาระดับของสารต้านออกซิเดชัน โดยการวัดระดับ total antioxidant status (4) พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ TAS ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จากการที่ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับอนุมูลอิสระสูงและระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ จึงบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติสอดคล้องกับผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ (6) และเป็นการยืนยันว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (32, 91, 92)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ LINE1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าระดับ LINE1 methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความสัมพันธ์นี้อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยผู้วิจัยคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไกดังต่อไปนี้ 1) ความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เนื่องจากสารอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย โดยการไปออกซิไดซ์เบสกวีนีน

(guanine) เกิดเป็น 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งเกิดอย่างไม่จำเพาะและมีโอกาสเกิดขึ้นได้ในบริเวณ CpG dinucleotides มีผลไปขัดขวางการจับของเอนไซม์ DNMT ในการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีน (cytosine) ที่อยู่ติดกับเบสกวานีนตัวที่ถูกออกซิไดซ์นั้น (13, 14) และหาก 8-OHdG ไม่ได้รับการซ่อมแซมที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ แบบ G-T transversion ได้ ซึ่งหากเกิดที่บริเวณ CpG dinucleotide จะทำให้มีปริมาณ CpG dinucleotide ลดลง 2) การกำจัดสารอนุมูลอิสระของร่างกาย เนื่องจากเมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือมีปริมาณสารอนุมูลอิสระสูง จะทำให้เซลล์ต้องสร้างกลูตาไทโอน เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการป้องกันความเสียหายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และกลูตาไทโอนก็เป็นกลไกหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งโดยปกติกลูตาไทโอนจะสร้างจากกรดอะมิโน homocysteine ดังนั้นเมื่อมีภาวะ oxidative stress สูงจึงทำให้ปริมาณกรดอะมิโน homocysteine ที่ใช้สร้างกลูตาไทโอนไม่เพียงพอ เซลล์ต้องการ homocysteine เพิ่มมากขึ้น จึงต้องสลาย SAM ที่สร้างมาจากกรดอะมิโน methionine มาเป็น homocysteine แทนและในขณะเดียวกันก็ไม่มี homocysteine เหลือพอที่จะเปลี่ยนกลับไปเป็นกรดอะมิโน methionine จึงส่งผลให้ระดับของ methionine และ SAM ลดลง ทำให้ขาด SAM ที่จะไปใช้ในกระบวนการ DNA methylation ส่งผลให้ระดับของ SAM ในเซลล์ลดลงและนำไปสู่การเกิด genome-wide DNA hypomethylation (57-59) ซึ่งแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงระดับหรือการสร้าง glutathione จากภาวะ oxidative stress มีผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการ DNA methylation โดยการไปเปลี่ยนแปลงปริมาณ SAM ในเซลล์

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ LINE1 hypomethylation และภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูง ซึ่งพบว่า LINE1 hypomethylation สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษากภาวะเครียดจากออกซิเดชันในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ นอกจากความเสียหายของโปรตีนจากออกซิเดชันแล้ว ความเสียหายของดีเอ็นเอก็เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญ ซึ่งสารที่นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการบาดเจ็บของดีเอ็นเอจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน คือ 8-OHdG มีการศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมากที่พบ ระดับ 8-OHdG สูงในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและรายงานไว้ว่า 8-OHdG มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (93-95) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ จึงมีความเกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอโดยตรง ดังนั้นความ

เสียหายที่เกิดกับดีเอ็นเอจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันจึงก็อาจส่งผลต่อระดับการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอด้วย ดังนั้นจึงควรทำการวิเคราะห์ระดับของ 8-OHdG เพิ่มเติม เพื่อเป็นการยืนยันว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเสียหายและเป็นผลให้ผู้ผู้ป่วยมีระดับการเกิด LINE1 methylaton ต่ำกว่าคนปกติ เพื่อให้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ LINE1 methylation ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรเพิ่มขนาดประชากรของกลุ่มควบคุมคนปกติที่ใช้ในการศึกษาให้ได้ใกล้เคียงกับขนาดประชากรของกลุ่มผู้ป่วยมากขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Kitamura, H.,and Tsukamoto, T. Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. International Journal of Clinical Oncology.11,1(2006): 28-37.
- [2] Parkin, D.M., Pisani, P.,and Ferlay, J. Global cancer statistics. CA: A cancer journal for clinicians.49,1(1999): 33-64.
- [3] Mitra, A.P.,and Cote, R.J. Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. Nature Reviews Urology.7,1(2010): 11-20.
- [4] Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Sriplung, H., Wiangnon, S., Sumitsawan, Y.,and Attasara, P. Cancer in Thailand Vol. IV, 1998-2000. Bangkok: Ministry of Public Health, Ministry of Education; 2007.
- [5] Rosella, S., Sara, B., Valentina, C., Dino, A.,and Daniele, C. The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. Indian Journal of Urology.25.
- [6] Wayakkanont, U., et al. Efficacy of combined treatment between lime powder and curcumin supplementation on reduction of superficial bladder cancer recurrence: A preliminary randomized controlled trial. Chulalongkorn Medical Journal.53,3(2009): 199-214.
- [7] Augustine, A., Hebert, J.R., Kabat, G.C.,and Wynder, E.L. Bladder cancer in relation to cigarette smoking. Cancer research.48,15(1988): 4405.
- [8] Taylor, J.A., et al. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. Cancer research.58,16(1998): 3603.
- [9] Choi, S.H., et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. International journal of cancer.125,3(2009): 723-9.
- [10] Ting Hsiung, D., et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.16,1(2007): 108.

- [11] Chalitchagorn, K., et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene.23,54(2004): 8841-6.
- [12] Hitchler, M.J.,and Domann, F.E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Free Radical Biology and Medicine.43,7(2007): 1023-36.
- [13] Weitzman, S.A., Turk, P.W., Milkowski, D.H.,and Kozlowski, K. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.91,4(1994): 1261.
- [14] Turk, P.W., Laayoun, A., Smith, S.S.,and Weitzman, S.A. DNA adduct 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. Carcinogenesis.16,5(1995): 1253.
- [15] Wachsman, J.T. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.375,1(1997): 1-8.
- [16] Kazazian, H.H.,and Moran, J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nature Genetics.19,1(1998): 19-24.
- [17] Lander, E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature.409,6822(2001): 860-921.
- [18] Stribinskis, V.,and Ramos, K.S. Activation of human long interspersed nuclear element 1 retrotransposition by benzo (a) pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen. Cancer research.66,5(2006): 2616.
- [19] Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A.,and Jaenisch, R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science.300,5618(2003): 455.
- [20] Wilhelm, C.S., et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. Clinical Cancer Research.16,5(2010): 1682.

- [21] Y Imaz, I.A., Ak ay, T., akatay, U., Telci, A., Ataus, S.,and Yal n, V. Relation between bladder cancer and protein oxidation. International urology and nephrology.35,3(2003): 345-50.
- [22] Jemal, A., et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians.58,2(2008): 71.
- [23] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J.,and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians.55,2(2005): 74-108.
- [24] Bravaccini, S., Casadio, V., Amadori, D., Calistri, D.,and Silvestrini, R. The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India.25,1(2009): 40.
- [25] Morales, A., Eiding, D.,and Bruce, A. Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. The Journal of urology.116,2(1976): 180.
- [26] Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Malvezzi, M.,and La Vecchia, C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. Nature Clinical Practice Urology.3,6(2006): 327-40.
- [27] Ward, E.M., et al. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. Journal of the National Cancer Institute.88,15(1996): 1046.
- [28] Mitra, A.P.,and Cote, R.J. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. Annual Review of Pathological Mechanical Disease.42(2009): 251-85.
- [29] Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. Journal of Biological Chemistry.272,34(1997): 20963.
- [30] Furukawa, S., et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest.114,12(2004): 1752-61.
- [31] Marshall, P.J., Warso, M.A.,and Lands, W.E.M. Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. Analytical biochemistry.145,1(1985): 192-9.
- [32] Kadlubar, F.F., Butler, M.A., Kaderlik, K.R., Chou, H.C.,and Lang, N.P. Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. Environmental health perspectives.98(1992): 69.

- [33] Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Molecular nutrition & food research.52,5(2008): 507-26.
- [34] Evans, M.D., Dizdaroglu, M.,and Cooke, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation Research/Reviews in Mutation Research.567,1(2004): 1-61.
- [35] Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis.21,3(2000): 361.
- [36] Moriya, M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC--> TA transversions in simian kidney cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.90,3(1993): 1122.
- [37] Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N., Robbins, P.,and Sakai, T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. Oncogene.8,4(1993): 1063.
- [38] Herman, J.G., et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.91,21(1994): 9700.
- [39] Yang, B., Guo, M., Herman, J.G.,and Clark, D.P. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. American Journal of Pathology.163,3(2003): 1101.
- [40] Kuroki, T., et al. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR- , RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer research.63,13(2003): 3724.
- [41] Feinberg, A.P.,and Vogelstein, B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. Biochemical and biophysical research communications.111,1(1983): 47-54.
- [42] FANG, J.Y., et al. Studies on the hypomethylation of c myc, c Ha ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. Journal of gastroenterology and hepatology.11,11(1996): 1079-82.

- [43] Yuille, M.R., et al. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. Genes, Chromosomes and Cancer.30,4(2001): 336-41.
- [44] Gupta, A., Godwin, A.K., Vanderveer, L., Lu, A.P.,and Liu, J. Hypomethylation of the synuclein gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. Cancer research.63,3(2003): 664.
- [45] Bacolla, A., Pradhan, S., Larson, J.E., Roberts, R.J.,and Wells, R.D. Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. Journal of Biological Chemistry.276,21(2001): 18605.
- [46] Kautiainen, T.L.,and Jones, P.A. DNA methylation in mammalian nuclei. Biochemistry.24,20(1985): 5575-81.
- [47] Bolden, A., Nalin, C., Ward, C., Poonian, M.,and Weissbach, A. Primary DNA sequence determines sites of maintenance and de novo methylation by mammalian DNA methyltransferases. Molecular and cellular biology.6,4(1986): 1135.
- [48] Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A.,and Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell.99,3(1999): 247-57.
- [49] Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A.G.,and Panayiotidis, M.I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer letters.266,1(2008): 6-11.
- [50] Klaunig, J., Kamendulis, L.,and Xu, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. Human & experimental toxicology.19,10(2000): 543.
- [51] Smit, A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. Current opinion in genetics & development.6,6(1996): 743-8.
- [52] Sassaman, D.M., et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. Nature Genetics.16,1(1997): 37-43.
- [53] Herman, J.G., Graff, J.R., My h nen, S., Nelkin, B.D.,and Baylin, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.93,18(1996): 9821.

- [54] Evron, E., et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. The Lancet.357,9265(2001): 1335-6.
- [55] Xiong, Z.,and Laird, P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic acids research.25,12(1997): 2532.
- [56] Pobsook, T., Subbalekha, K., Sannikorn, P.,and Mutirangura, A. Improved measurement of LINE-1 sequence methylation for cancer detection. Clinica Chimica Acta. 2010).
- [57] Lertratanangkoon, K., Savaraj, N., Scimeca, J.M.,and Thomas, M.L. Glutathione depletion-induced thymidylate insufficiency for DNA repair synthesis. Biochemical and biophysical research communications.234,2(1997): 470.
- [58] Lertratanangkoon, K., Orkiszewski, R.S.,and Scimeca, J.M. Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion. Cancer research.56,5(1996): 995.
- [59] Lertratanangkoon, K., Wu, C.J., Savaraj, N.,and Thomas, M.L. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. Cancer letters.120,2(1997): 149-56.
- [60] Hepburn, P., Margison, G.,and Tisdale, M. Enzymatic methylation of cytosine in DNA is prevented by adjacent O6-methylguanine residues. Journal of Biological Chemistry.266,13(1991): 7985.
- [61] Tan, N.W.,and Li, B.F.L. Interaction of oligonucleotides containing 6-O-methylguanine with human DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. Biochemistry.29,39(1990): 9234-40.
- [62] Xiao, W.,and Samson, L. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.90,6(1993): 2117.
- [63] Christman, J.K., Sheikhejad, G., Marasco, C.J.,and Sufrin, J.R. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.92,16(1995): 7347.

- [64] Levine, R., Williams, J., Stadtman, E., and Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in enzymology.233(1994): 346-57.
- [65] Janaszewska, A., and Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scandinavian journal of clinical & laboratory investigation.62,3(2002): 231-6.
- [66] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry.72,1-2(1976): 248-54.
- [67] Mutirangura, A. Quantitative PCR analysis for methylation level of genome: clinical implications in cancer. Asian Biomed.1,2(2007): 121.
- [68] Kitkumthorn, N., and Mutirangura, A. LINE 1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. Oral diseases.16,3(2010): 286-91.
- [69] Yoshifumi, B., et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. Molecular Cancer.9.
- [70] Lee, H.S., et al. Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma. Clinical Cancer Research.15,3(2009): 812.
- [71] Phokaew, C., Kowudtitham, S., Subbalekha, K., Shuangshoti, S., and Mutirangura, A. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. Nucleic acids research.36,17(2008): 5704.
- [72] Moore, L.E., et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. The lancet oncology.9,4(2008): 359-66.
- [73] Dean, R., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochemical Journal.324,Pt 1(1997): 1.
- [74] Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Journal of Biological Chemistry.272,33(1997): 20313.

- [75] Chevion, M., Berenshtein, E., and Stadtman, E. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. Free radical research.33(2000): S99.
- [76] Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples 1*. Drug metabolism reviews.32,3-4(2000): 307-26.
- [77] Beal, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free radical biology & medicine.32,9(2002): 797.
- [78] Smith, C., et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.88,23(1991): 10540.
- [79] Conrad, C.C., Marshall, P.L., Talent, J.M., Malakowsky, C.A., Choi, J., and Gracy, R.W. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. Biochemical and biophysical research communications.275,2(2000): 678-81.
- [80] Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D., Geddes, J., and Markesbery, W. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. Neuroscience.103,2(2001): 373-83.
- [81] Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Conrad, C.C., and Gracy, R.W. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease* 1. Biochemical and biophysical research communications.293,5(2002): 1566-70.
- [82] Grattagliano, I., Vendemiale, G., Boscia, F., Micelli-Ferrari, T., Cardia, L., and Altomare, E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. Free Radical Biology and Medicine.25,3(1998): 369-72.
- [83] Dom nguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., and Carrascosa, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. Diabetes care.21,10(1998): 1736.
- [84] Telci, A., akatay, U., Salman, S., Satman, I., and Sivas, A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. Diabetes research and clinical practice.50,3(2000): 213-23.

- [85] Lih-Brody, L., et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. Digestive diseases and sciences.41,10(1996): 2078-86.
- [86] Mantle, D., Falkous, G.,and Walker, D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. Clinica Chimica Acta.284,1(1999): 45-58.
- [87] Renke, J., Popadiuk, S., Korzon, M., Bugajczyk, B.,and Wozniak, M. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. Free Radical Biology and Medicine.29,2(2000): 101-4.
- [88] De Maria, N., et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. Free Radical Biology and Medicine.21,3(1996): 291-5.
- [89] Popadiuk, S., Korzon, M.,and Renke, J. Carbonyl groups content on the basis of protein peroxidation analysis with total antioxidant status in blood of children with cancers. Wiadomo ci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960).511998): 107.
- [90] Pignatelli, B., et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. Cancer research.61,2(2001): 778.
- [91] Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H.,and Murai, M. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. British journal of cancer.76,2(1997): 206.
- [92] Brown, N., Streeter, E., Jones, A., Harris, A.,and Bicknell, R. Cooperative stimulation of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and reactive oxygen species: the effect of targeting vascular endothelial growth factor and oxidative stress in an orthotopic xenograft model of bladder carcinoma. British journal of cancer.92,9(2005): 1696-701.

- [93] Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., and Wu, J.T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clinica Chimica Acta.339,1-2(2004): 1-9.
- [94] Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C., and Wu, J.T. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. Clinica Chimica Acta.334,1-2(2003): 87-94.
- [95] Ak ay, T., Sayg l , I., Andican, G., and Yal n, V. Increased Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Peripheral Blood Leukocytes in Bladder Cancer. Urologia internationalis.71,3(2000): 271-4.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ protein carbonyl ในซีรัม

1. Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH 7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl))
 - 1.1. ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.98) 1.42 g และ NaCl (MW=58.44) 8.18 g
 - 1.2. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml
 - 1.3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

2. Trichloroacetic acid (TCA) (20% w/v)
 - 2.1. ชั่ง TCA 20 g เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml

3. Dinitrophenylhydrazine (DNPH) (10 mM DNPH ใน 2N hydrochloric acid (HCl))
 - 3.1. เติม HCl 98.5ml ในน้ำกลั่น 500 ml
 - 3.2. ชั่ง DNPH (MW=198.14) 0.99 g ละลายใน HCl ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1

4. Ethanol:Ethyl acetate (1:1)
 - 4.1. ผสม 95% ethanol 500 ml กับ ethyl acetate 500 ml ให้เข้ากัน

5. Guanidine hydrochloride (GdmCl) (6 M GdmCl และ 0.5 M potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4), pH 2.5)
 - 5.1. ชั่ง KH_2PO_4 (MW=136.09) 34.023 g และ GdmCl (MW=95.53) 286.6 g
 - 5.2. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml
 - 5.3. ปรับ pH ให้ได้ 2.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 ml

การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ total antioxidant status (TAS) ในปัสสาวะ

1. Sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)

- 1.1. เตรียม solution A โดยชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW=137.99) 0.69 g แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 1000 ml
 - 1.2. เตรียม solution B โดยชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.98) 0.71 g แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 1000 ml
 - 1.3. เตรียม solution AB โดยผสม solution A 18 ml กับ solution B 82 ml
 - 1.4. ผสม solution AB กับ 0.9% NaCl ในอัตราส่วน 1:1
2. Sodium chloride (NaCl) (0.9 % w/v)
 - 2.1. ชั่ง NaCl (MW=58.44) 0.9 g แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml
 3. 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) (0.1 mM DPPH ใน absolute methanol)
 - 3.1. ชั่ง DPPH (MW=394.32) 0.0394 g ละลายใน absolute methanol 1000 ml

การเตรียมสารเคมีในการตรวจวัดระดับของ LINE1 methylation

1. Sodium hydroxide (NaOH) (10 M)
 - 1.1. ชั่ง NaOH 1 เม็ด แล้วเติมน้ำกลั่น = $(5/2) \times$ น้ำหนักของ NaOH เม็ด(g) ml
2. Sodium hydroxide (NaOH) (2M และ 3M)
 - 2.1. เตรียม 2M NaOH โดยนำ 10M NaOH มา 100 μl แล้วเติมน้ำกลั่น 400 μl
 - 2.2. เตรียม 3M NaOH โดยนำ 10M NaOH มา 150 μl แล้วเติมน้ำกลั่น 350 μl
3. Sodium metabisulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)(3M, pH 5.0)
 - 3.1 ชั่ง $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (MW=190.11) 1.88 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml (สำหรับ 10 reaction) ผสมให้เข้ากัน
 - 3.1 ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยใช้ 10M NaOH ที่เตรียมไว้ในข้อ 1
4. Hydroquinone ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$)
 - 4.1 ชั่ง hydroquinone (MW=110.10) ให้ได้ปริมาณน้อยๆ
 - 4.2 แล้วเติมน้ำกลั่น = $(50/55) \times$ น้ำหนักของ hydroquinone ที่ชั่งได้(mg) ml

5. **Tris- Boric -EDTA buffer (TBE buffer) (10X, pH 8.3)**
 - 5.1. ละลาย Tris base (MW=121.14) 108 g และ boric acid (MW=61.83) 55 g ในสารละลาย 0.5M EDTA (pH 8.0) 40 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
 - 5.2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
 - 5.3. เจือจางเป็นสารละลายเข้มข้น 1X เพื่อใช้เป็น electrophoresis buffer

6. **Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.5 M, pH 8.3)**
 - 6.1. ละลาย EDTA (MW=292.24) 16.81 g ในน้ำกลั่น 80 ml ค่อยๆเติมสารละลาย NaOH เข้มข้นให้ได้ pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml
 - 6.2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. **Ammonium acetate (CH₃COONH₄) (10M)**
 - 7.1. ชั่ง CH₃COONH₄ (MW=77.08) 7.71 g แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 ml

8. **Glycogen (20 mg/ml)**
 - 8.1. ละลาย glycogen 10 mg (type XI from oysters) ในน้ำกลั่น 500 μ l ผสมให้เข้ากัน

9. **Isopropanol (80% v/v)**
 - 9.1. นำ isopropanol มาปริมาตร 80 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 100 ml



ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ
(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชั่นของไลโนลีน และภาวะ เครียดจากออกซิเดชัน ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาวมธุรดา เพชรสังข์
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-9097-2512

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขโขวงศ์
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-1518-7618

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า
 ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4482 มือถือ 08-1320-6627

ชื่อ ศาสตราจารย์ นพ.ดร. อภิวัฒน์ มุทิตางกูร
 ที่อยู่ ภาควิชากายวิภาค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 08-1348-8620

ชื่อ นพ. ภาสกร อำนาคตระกูล
 ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4117 มือถือ 08-9788-7677

ชื่อ นพ. จุรินทร์ โอภาณูรักษ์
 ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4515 มือถือ 08-1834-8034

ชื่อ ผศ.นพ.สุพจน์ รัชชานนท์
 ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4515

เรียนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก และอุบัติการณ์มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากสถิติมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบบ่อยเป็นอันดับสองในกลุ่มมะเร็งทางเดินปัสสาวะ และพบได้บ่อยเป็นลำดับที่หกจากมะเร็งทุกชนิดทั่วโลก มะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบในชายมากกว่าในหญิง 3-4 เท่า ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุระหว่าง 65-84 ปี ปัญหาสำคัญของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะคือการกลับเป็นมะเร็งซ้ำภายหลังการผ่าตัด ซึ่งพบได้สูงมากถึงร้อยละ 80 โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจึงจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในผู้สูงอายุทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ดังนั้นการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ เพื่อลดโอกาสการเกิดมะเร็งซ้ำจึงเป็นปัญหาวิจัยที่ทำนายและได้รับความสนใจสูง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับความเครียดจากออกซิเดชันสูง นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของภาวะเหนือพันธุกรรมหลายแบบในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอเล็กน้อยเกินไปสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอเล็กน้อยเกินไปนี้ทำให้ความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพิ่มขึ้น 1-2 เท่า แต่ปัจจุบันความรู้ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเหนือพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะยังมีน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจระดับการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ และระดับความเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งผลการศึกษานี้จะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกของภาวะเหนือพันธุกรรมต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและน่าจะมีประโยชน์ต่อการนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและปรับเปลี่ยนรูปแบบการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเติมหมู่เมทิลให้กับ ดีเอ็นเอและระดับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยแบ่งเป็น คนปกติ 69 คน และผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 69 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอพิจารณาผลการวินิจฉัยของแพทย์ว่าท่านเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดใด เพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่แพทย์ผู้ทำการผ่าตัดนัดหมายเพื่อเอาก้อนมะเร็งออก โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 1 ปี และมาพบผู้วิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยทั้งสิ้น 1 ครั้ง โดยผู้วิจัยจะทำการเก็บสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือ เลือด และปัสสาวะตอนเช้า ของวันที่ท่านจะทำการผ่าตัด (ก่อนทำการผ่าตัด ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) สำหรับเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เก็บขณะทำการผ่าตัดโดยศัลยแพทย์ที่ทำการผ่าตัดผู้ป่วย

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะตอนเช้า ท่านจะได้รับการแนะนำจากแพทย์หรือคณะวิจัย เกี่ยวกับการเก็บสารตัวอย่างที่ถูกต้อง จากนั้นท่านจะได้รับแจกอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อเก็บสารตัวอย่างด้วยตัวท่านเอง สำหรับตัวอย่างเลือดแพทย์หรือพยาบาลจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณท้องแขน ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา)

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จะกระทำโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะผู้ทำการผ่าตัดรักษา การเก็บตัวอย่างจะเก็บด้วยวิธีที่เป็นมาตรฐานสากล ชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เก็บจะมีขนาดประมาณหนึ่งลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากการผ่าตัดและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ผู้ป่วยสามารถฟื้นตัวได้ตามปกติโดยโอกาสเกิดเลือดออกหรือภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ เกิดขึ้นได้น้อยมาก

เมื่อเก็บสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จะนำไปยังห้องปฏิบัติการวิจัย และทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างตามที่วางแผนไว้ในโครงการวิจัย โดยตัวอย่างเลือดและปัสสาวะจะวัดปริมาณครีเอตินีน วัดตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และวัดระดับการเกิดเมทิลเลชันของไลโนวัน เพื่อดูระดับการเกิดเมทิลเลชันของไลโนวันและภาวะเครียดจากออกซิเดชันเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะวัดระดับการเกิดเมทิลเลชันของไลโนวัน เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิดเมทิลเลชันของไลโนวันในเลือด ปัสสาวะและเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือด ซึ่งพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็ง

ระหว่างการเก็บตัวอย่างโดยตัดชิ้นเนื้อมะเร็งขนาดเล็ก ท่านมีโอกาเลือดออกได้ อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างนี้กระทำโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะที่มีความชำนาญสูง โอกาสเกิดเลือดออกหรือภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ เกิดขึ้นได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งแพทย์ผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อมีความผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

- ผู้ป่วยไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการวิจัยนี้

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัย
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้วิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

ค่าชดเชยสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับค่าเดินทางและค่าชดเชยเสียเวลาในการเข้าร่วมโครงการวิจัย ครั้งละ 500 บาท จำนวน 1 ครั้ง

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นพ. จุลินทร์ โภภานุรักษ์ ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน ทั้งนี้เว้นแต่จะมีคำสั่งศาลให้เปิดเผยข้อมูลดังกล่าว

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
6. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
7. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
8. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารชี้แจงข้อมูลงานวิจัยและใบยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัยที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่

9. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้สิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent form)

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันของ LINE1 และภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Relationship between LINE1 methylation and oxidative stress in bladder cancer patients)

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่อยู่.....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาแล้วและข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางการรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

เว้นแต่จะมีคำสั่งศาลให้เปิดเผยข้อมูล ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงาน เพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ และการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคต เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัว

บรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนาม หรือประทับลายนิ้วหัวแม่มือขวาของข้าพเจ้าในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัว

บรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัว

บรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ศูนย์วิทยพัชการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ผลงานวิทยานิพนธ์ที่ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 3rd Biochemistry and Molecular Biology (BMB) International Conference 2011



April 6th, 2011

Dear Miss.Maturada Patchsung,

On behalf of the Organizing Committee, I would like to extend my deepest thanks and appreciation to you for your efforts in the poster presentation "P2-06 title **Association of LINE-1 Hypomethylation with Increased Oxidative Stress in Patients with Bladder Cancer**" at the 3rd BMB International Conference 2011 which is held during April 6-8, 2011 in Chiang Mai, Thailand.

The Chairman and Board Members of BMB section, the Science Society of Thailand, have also asked me to pass on their sincere appreciation for your supports in the success of the conference. Your enthusiasm and efforts have greatly contributed to the scientific quality of the conference. We believe that this conference can be a significant milestone. We hope that you will keep up the good work and are willing to participate again in the future event.

Again, thanks so much for your enthusiastic contribution in our conference. I have no doubt that it would not have been the success that it was without your presence.

Sincerely,

Assoc.Prof. Dr. Pornngarm Dejkiengkraikul
Chairperson, the Organizing Committee
The 3rd BMB Conference 2011

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวมธุรดา เพชรสังข์
วัน เดือน ปีเกิด	21 กรกฎาคม พ.ศ.2528
สถานที่เกิด	นนทบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประสบการณ์การทำงาน	ผู้ช่วยนักวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ.2551 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2552
ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์	ชื่อเรื่อง ความสัมพันธ์ของ เหล็ก สังกะสีและ นิกเกิลในปัสสาวะ กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ลงในวารสารยูโร ฉบับปีที่ 31

ศูนย์วิทยพัทธยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย