



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันของยีน *STK38* ในมะเร็งรังไข่
Methylation analysis of the *STK38* gene in ovarian cancer

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐนิชา มุกตาม่วง เลขประจำตัว 5832114323

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันของยีน STK38 ในมะเร็งรังไข่

นางสาวณัฐนิชา มุกตาม่วง

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Methylation analysis of the *STK38* gene in ovarian cancer

Miss Nudnicha Mookdamuang

A senior project submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of bachelor of science
program genetics, department of botany
faculty of science, chulalongkorn university
academic year 2018

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันของยีน <i>STK38</i> ในมะเร็งรังไข่
ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	Methylation analysis of the <i>STK38</i> gene in ovarian cancer
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐนิชา มุกตาม่วง
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาพันธุศาสตร์

.....*รัชนิกร ธรรมโชติ*.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

.....*ทพ.นครินทร์ กิตกำธร*.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร)

.....*ทพ.นครินทร์ กิตกำธร*.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธำรินทร์ ไถ่ตระภูล)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันของยีน STK38 ในมะเร็งรังไข่
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐนิชา มุกดาม่วง
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่จัดเป็นโรคมะเร็งที่พบได้เป็นอันดับที่ 6 ในผู้หญิง โดยระยะแรกของโรคนั้นไม่มีอาการแสดงออกอย่างชัดเจน ทำให้ยากต่อการตรวจพบ รวมถึงยากต่อการรักษา ดังนั้น การวินิจฉัยโรคในระยะแรกจะช่วยเพิ่มโอกาสในการรักษาที่ประสบความสำเร็จได้มากขึ้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อตรวจสอบระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน STK38 ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ โดยจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าการเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน STK38 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งรังไข่ ในการทดลองครั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่าง คือ ชิ้นเนื้อรังไข่ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ 30 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อรังไข่ของบุคคลปกติ 20 ตัวอย่าง โดยแบ่งบางส่วนเพื่อนำไปตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin and eosin stain และอีกส่วนนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยผ่านกระบวนการ bisulfite conversion และตรวจสอบด้วยวิธี Methylation-specific PCR (MSP) ร่วมกับการทำ real-time PCR ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี MSP พบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ยีน STK38 ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าการเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน STK38 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งรังไข่อย่างมีนัยสำคัญ ค่า p คือ 0.0001 จึงสรุปได้ว่าการตรวจสอบระดับเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP เพียงอย่างเดียวไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค ดังนั้น ควรตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาร่วมด้วยซึ่งพบความสัมพันธ์กับการเกิดโรค

คำสำคัญ : มะเร็งรังไข่, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, Methylation-specific PCR, ยีน STK38

Title	Methylation analysis of the <i>STK38</i> gene in ovarian cancer
Student name	Ms.Nudnicha Mookdamuang
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Nakarin Kitkumthorn
Academic year	2018

ABSTRACT

Ovarian cancer is the sixth most common cancer in women. This cancer no specific symptoms are presented in the early stages, making it difficult to detect and treat. Therefore diagnosis in the early stages will increase the chances of successful treatment. The objective of this study is to analyze the level of DNA methylation in the *STK38* gene, which has been reported to be associated with cell cycle and apoptosis. A previous study indicated that hypomethylation in the *STK38* gene was associated with ovarian cancer. In the present study, ovarian tissue samples from 30 ovarian cancer patients and 20 normal women were collected. Parts of the tissues were analyzed by histopathology stains and the other were processed for DNA extraction. The DNA methylation level was analyzed by Methylation-specific PCR (MSP) and real-time PCR. No significant difference between DNA methylation levels in the *STK38* gene between ovarian cancer patients and normal controls was observed. But if analyzed together with results from histopathology, the *STK38* DNA methylation level was associated with ovarian cancer ($p=0.0001$). Therefore, results from this study indicated that DNA methylation level alone was not associated with the disease occurrence, but should be analyzed together with histopathology analysis.

Keywords: ovarian cancer, DNA methylation, Methylation-specific PCR, *STK38* gene

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และรองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกัาธร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอกราบขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยอณูชีววิทยา และพันธุศาสตร์ของการเกิดมะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เชื้อเพื่ออุปกรณ์รวมถึงสถานที่ในการทำโครงการ และขอขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการทุกคนที่คอยให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอกราบขอบคุณภาควิชาสถิติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับตัวอย่างที่ถูกต้องใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอกราบขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นแหล่งให้ความรู้ และสถานที่ทำงาน

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณนางสาวธมนวรรณ มีสกุล และนายชวิศ พลพงษ์ ที่คอยให้คำปรึกษาในการทำโครงการ รวมถึงเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบคุณศิลปินไทยวง หิน เหล็ก ไฟ และศิลปินเกาหลีวง Girls' Generation, Monsta X, YDPP, จอง เซอุน รวมถึงศิลปินท่านอื่น ๆ ที่เป็นที่พักพิงในเวลาที่เหนื่อยล้าจากการทำโครงการในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยรับฟังเรื่องราวต่าง ๆ และให้คำปรึกษาตลอดการทำงาน รวมถึงคอยให้กำลังใจ และการสนับสนุนตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผล	28
รายการเอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	35

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 การทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs)	5
รูปที่ 2.2 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณ CpG island	6
รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการ bisulfite conversion	7
รูปที่ 2.4 ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธี MSP กับดีเอ็นเอที่ผ่านการ ทำ bisulfite conversion	8
รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของ SYBR [®] green	9
รูปที่ 4.1 ลำดับเบสที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion และบริเวณตำแหน่ง cg02964385 ที่โปรโมเตอร์บนยีน <i>STK38</i>	18
รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน <i>STK38</i>	19
รูปที่ 4.3 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของ <i>STK38</i> และ beta-actin ด้วยกระบวนการ gradient PCR	22
รูปที่ 4.4 unmethylation standard curve และสมการความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	24
รูปที่ 4.5 กราฟค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่างของ ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติ	27

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลำดับเบส และ PCR product ของ Methylation beta-actin primer	14
ตารางที่ 4.1 ลำดับเบส และ PCR product ของ methylation <i>STK38</i> primer และ unmethylation <i>STK38</i> primer	20
ตารางที่ 4.2 ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรค	21
ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า C_t จากดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่	26
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ย ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ด้วยวิธีการย้อม H&E	26
ตารางที่ 1 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย unmethylation <i>STK38</i> primer	36
ตารางที่ 2 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย methylation <i>STK38</i> primer	38
ตารางที่ 3 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย methylation beta-actin primer	39
ตารางที่ 4 ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer และความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ	41
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณของแต่ละตัวอย่าง และอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคด้วยวิธีการย้อม Hematoxylin and eosin stain (H&E)	43

บทที่ 1

บทนำ

มะเร็งรังไข่เป็นโรคมะเร็งที่พบได้เป็นอันดับที่ 6 ของมะเร็งในผู้หญิง ซึ่งมะเร็งรังไข่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ มะเร็งเยื่อบุผิวรังไข่ มะเร็งฟองไข่ และมะเร็งเนื้อรังไข่ โดยมะเร็งเยื่อบุผิวรังไข่จัดเป็นกลุ่มมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุด (Corrigan, 2017) โดยในระยะแรกจะไม่มีอาการแสดงอาการ ทำให้วินิจฉัยโรคได้ยาก ส่วนใหญ่จะตรวจพบโรคในระยะที่มะเร็งลุกลามไปมากแล้ว (Ozdemir et al., 2012) ซึ่งจะมีอาการเบื่ออาหาร ปวดท้องน้อย เจ็บในขณะมีเพศสัมพันธ์ คลำพบก้อนเนื้อบริเวณท้องน้อย และอาจมีอาการแทรกซ้อนอื่น ๆ เนื่องจากการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณข้างเคียง (Braun, 2015) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคได้ในระยะแรกจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาเป็นอย่างมาก

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ ได้แก่ อายุ ยากะตุ้นการตกไข่ การใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนนานกว่า 5 ปี การมีประจำเดือนก่อนอายุ 12 ปี และพันธุกรรม (Braun, 2015) จากการศึกษาพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *AT-Rich Interaction Domain 1A (ARID1A)* จะทำให้ยีนสูญเสียการทำงาน และส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ได้ (Fukumoto et al., 2018) ซึ่งนอกจากการเกิดการกลายพันธุ์บนยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งรังไข่แล้ว ยังมีสาเหตุมาจากเอพิเจเนติกส์ (epigenetics) อีกด้วย โดยเป็นกระบวนการที่ทำให้ยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างไปจากเดิม โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนดีเอ็นเอ และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ เช่น การตัดแปลงที่บริเวณหางของฮิสโตน การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน และกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (ไซติกา หยกทองวัฒนา, 2554) พบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบน *Breast Cancer 1 (BRCA1)* ทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ลดลง และมีผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (Baldwin et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษายีนที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ เช่น *mutL Homolog 1 (MLH1)* ยีน *Homeobox A9 (HOXA9)* และ *Claudin 4 (CLDN4)* เป็นต้น โดยการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ยีนดังกล่าวจะทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ผิดปกติไปจากเดิม และส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (Koukoura et al., 2014)

กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ การเติมหมู่เมทิลลงไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ที่อยู่ติดกับเบสกวานีน โดยดีเอ็นเอเมทิลเลชันมักพบได้มากที่บริเวณ CpG island ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสไซโตซีน (cytosine) อยู่ติดกับเบสกวานีน (guanine) เป็นจำนวนมาก (Ozdemir et al., 2012) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ไฮโปเมทิลเลชัน และไฮเปอร์เมทิลเลชัน (Plass, 2011) โดยไฮโปเมทิลเลชัน คือ การเติมหมู่เมทิลที่น้อยกว่าปกติ ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกมากกว่าปกติ

โดยในโรคมะเร็งการเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีนก่อนมะเร็งจะชักนำให้มีการแสดงออกของโรคมะเร็ง (Earp and Cunningham, 2015) เช่น การเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน *CLDN4* ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนก่อนมะเร็ง (Koukoura et al., 2014) ในขณะที่ไฮเปอร์เมทิลเลชัน คือ การเติมหมู่เมทิลที่มากกว่าปกติ ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกลดลง ซึ่งอาจชักนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ รวมถึงการเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันที่ยีนต้านมะเร็งก็มีผลต่อการเกิดมะเร็งด้วยเช่นกัน (Ozdemir et al., 2012) เช่น การเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันที่ยีน *MLH1* และ *HOXA9* จะทำให้ยีนมีการแสดงออกลดลง และมีผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (Widschwendter et al., 2009)

ในโครงการนี้จะศึกษา ยีน *Serine/Threonine Kinase 38 (STK38)* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 บริเวณ p21.31 โดยยีนนี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ และยีนนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นยีนก่อนมะเร็ง การเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน *STK38* จะไปมีผลทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวมากเกินไปซึ่งจะชักนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งได้ ทั้งนี้การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน *STK38* พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น (Joffre et al., 2015)

จากการศึกษาที่ใช้วิธีทางชีวสารสนเทศในการตรวจสอบพบว่าการเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน *STK38* ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (ฟาติมา ตีบทา, 2560) และตรวจสอบตำแหน่งที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยการทำ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) (Xiong and Laird, 1997) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอีกครั้งด้วยวิธี Methylation-Specific PCR (MSP) ร่วมกับการทำ real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีรวมถึงในการออกแบบไพรเมอร์จะมีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา (Ku, Jeon and Park, 2009) และนำมาประเมินผลร่วมกับการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อม Hematoxylin and eosin stain (H&E) ซึ่งงานวิจัยนี้อาจก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การวินิจฉัยโรคที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น และสามารถนำผลที่ได้มาพัฒนาสำหรับการตรวจมะเร็งในระยะแรกต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันของยีน *STK38* ในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)

มะเร็งรังไข่เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติที่บริเวณรังไข่ โดยรังไข่เป็นหนึ่งในอวัยวะของระบบสืบพันธุ์ในเพศหญิง ปกติแล้วหากเซลล์บริเวณรังไข่เกิดความเสียหายหรือตาย ร่างกายจะทำการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นเพื่อนำไปทดแทนเซลล์ที่ได้รับความเสียหายดังกล่าว แต่เมื่อร่างกายมีการทำงานที่ผิดปกติจะส่งผลให้มีการสร้างเซลล์ที่ผิดปกติขึ้นมา และการทำงานที่ผิดปกติดังกล่าวก็จะนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งรังไข่ได้ (Corrigan, 2017)

ในประเทศไทย โรคมะเร็งรังไข่จัดเป็นมะเร็งที่พบได้มากในผู้หญิงไทย โดยการตรวจพบมะเร็งนี้มักตรวจพบได้ในระยะท้ายของโรคแล้ว ซึ่งมะเร็งนั้นได้ลุกลามไปสู่อวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ (รักษาติ บุญงาชาติ, 2550) การวินิจฉัยโรคนั้นมีหลายวิธี ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการสอบถามอาการร่วมกับการตรวจสุขภาพใน เช่น การตรวจสอดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงแบบดั้งเดิม หรือการใช้ค่าดัชนี Risk of malignancy index (RMI) เป็นต้น (พิสมัย เจริญปัญญาวิทย์ และคณะ, 2559) เนื่องจากมะเร็งรังไข่ยังไม่มีอาการที่เฉพาะเจาะจงจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอดเพิ่มเติมเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง และมีความแม่นยำ

ชนิดของมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ มะเร็งฟองไข่ มะเร็งเนื้อรังไข่ และมะเร็งเยื่อบุผิวรังไข่ โดยมะเร็งฟองไข่ (germ cell ovarian cancer) มีความผิดปกติมาจากเซลล์สืบพันธุ์ มะเร็งเนื้อรังไข่ (stromal cell ovarian cancer) จะมีความผิดปกติที่เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมนเพศหญิง โดยมะเร็งทั้ง 2 กลุ่ม จัดเป็นมะเร็งที่พบน้อยมาก ในขณะที่มะเร็งเยื่อบุผิวรังไข่ (epithelial ovarian cancer) จัดเป็นมะเร็งที่พบได้มาก โดยจะมีความผิดปกติที่เซลล์เยื่อบุผิวรังไข่ นอกจากนี้มะเร็งรังไข่ยังแบ่งออกเป็น 4 ระยะ โดยในระยะที่ 1 เซลล์มะเร็งจะลุกลามอยู่ภายในรังไข่ข้างเดียวหรืออาจทั้งสองข้าง ถัดมาในระยะที่ 2 เซลล์มะเร็งจะมีการลุกลามจากรังไข่ไปยังอวัยวะข้างเคียง เช่น มดลูก หรือเยื่อบุช่องเชิงกราน เป็นต้น ระยะที่ 3 เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง และโอเมนตัม (omentum) และระยะสุดท้าย เซลล์มะเร็งจะแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย เช่น ปอด ตับ เป็นต้น (Braun, 2015)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งรังไข่

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งรังไข่นั้นมีหลายปัจจัย โดยอายุถือเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคได้ เมื่ออายุมากขึ้นผู้หญิงจะเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะส่งผลให้รังไข่เสื่อมสภาพลง และส่งผลต่อการเกิดโรคได้ นอกจากนี้อายุแล้วการใช้ยาหรือสารทดแทนบางชนิดก็ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ได้เช่นกัน เช่น การใช้ฮอร์โมนทดแทนเป็นเวลานาน หรือ การรับประทานยาคุมกำเนิด เป็นต้น นอกจากนี้พันธุกรรมก็ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ โดยความผิดปกติของยีนบางยีนสามารถชักนำให้เกิดมะเร็งรังไข่ได้ ไม่ว่าจะเป็นการกลายพันธุ์ของยีน เช่น การกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* หรือการเกิดเอพิเจเนติกส์ เช่น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ล้วนส่งผลให้ยีนมีการทำงานที่ผิดปกติไปจากเดิม และนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งรังไข่ได้ (Salehi et al., 2008)

อาการของมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่เป็นโรคที่ไม่มีอาการเฉพาะเจาะจงมากจึงทำให้ยากต่อการวินิจฉัย รวมถึงยังทำให้ผู้ป่วยบางคนไม่คิดว่าอาการที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณของโรคมะเร็งรังไข่ ดังนั้นกว่าผู้ป่วยจะรู้ตัวก็พบว่ามะเร็งได้ลุกลามไปมากแล้ว ในระยะแรกจะไม่มีอาการแสดงออก ต่อมาจึงเริ่มมีอาการแสดงออกมา โดยลักษณะอาการที่มักพบ คือ ท้องอืด เจ็บปวดบริเวณเชิงกรานหรือท้อง ปัสสาวะบ่อย (Corrigan, 2017) รวมถึงยังมีอาการร่วมอื่นๆ เช่น เจ็บขณะมีเพศสัมพันธ์ เลือดออกทางช่องคลอด (vaginal bleeding) คลำพบก้อนเนื้อบริเวณท้องน้อย ประจำเดือนมาไม่ปกติ เป็นต้น (Braun, 2015)

การรักษามะเร็งรังไข่

การรักษาผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จะมีวิธีการรักษาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของมะเร็งรังไข่ที่ผู้ป่วยแต่ละคนประสบ อาการของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ รวมถึงระยะของมะเร็งรังไข่ที่ตรวจพบ โดยหลังจากได้รับการรักษาแล้วจำเป็นต้องมีการติดตามผลอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากมะเร็งรังไข่สามารถกลับมาเป็นซ้ำได้อีกครั้ง (พิสมัย เจริญปัญญาวิทย์ และคณะ, 2559)

มะเร็งเนื้อรังไข่ เป็นกลุ่มมะเร็งรังไข่ที่พบน้อยมาก โดยปกติแล้วในผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้จะพบเนื้องอกที่มีความเป็นมะเร็งต่ำ มักจะเป็นเพียงข้างเดียว และสามารถตรวจพบได้ในระยะเริ่มต้น แต่หากเนื้องอกดังกล่าวพัฒนาเป็นมะเร็ง จำเป็นต้องเข้ารับการผ่าตัดเพื่อทำการรักษา เช่นเดียวกับผู้ป่วยมะเร็งฟองไข่ ซึ่งเมื่อตรวจพบความผิดปกติจะต้องรับการรักษาด้วยการผ่าตัด และต้องมีการติดตามผลหลังการผ่าตัด โดยในผู้ป่วยบางรายอาจมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับยา

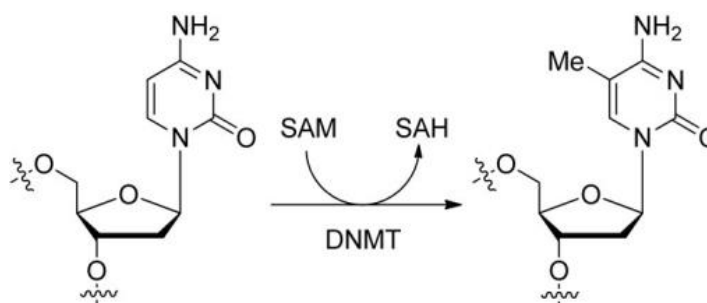
เคมีบำบัดในภายหลัง หรือหากผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดอาจพิจารณาการรักษาด้วยรังสีต่อไป และสุดท้ายในผู้ป่วยมะเร็งเยื่อบุผิวรังไข่ เป็นกลุ่มมะเร็งที่พบมากที่สุด และมีการรักษาหลากหลายรูปแบบ เนื่องจากการรักษาจะแบ่งออกตามระยะของมะเร็งที่ตรวจพบรวมถึงแบ่งตามระยะเวลาในการรักษา คือ การรักษาก่อนได้รับการผ่าตัด การรักษาหลังการผ่าตัด และการรักษาในกรณีที่กลับมาเป็นซ้ำอีกครั้ง โดยมักใช้การรักษาด้วยการผ่าตัดร่วมกับยาเคมีบำบัดเป็นหลัก (พิสมัย เจริญปัญญาวิทย์ และคณะ, 2559)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

ปัจจุบันมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชันจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ได้เช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีนบางยีนสามารถชักนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งรังไข่ได้ เช่น *BRCA1* และ *CLDN4* เป็นต้น (Baldwin et al., 2000)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันจัดเป็นหนึ่งในเอพิเจเนติกส์ โดยเอพิเจเนติกส์ คือ กระบวนการที่ทำให้ยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างไปจากเดิม โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนดีเอ็นเอ และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ (โชติกา หยกทองวัฒนา, 2554)

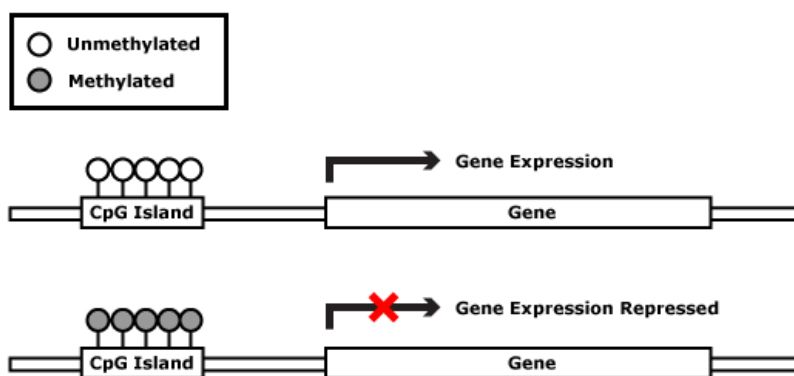
ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออก โดยดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นการเติมหมู่เมทิลไปยังคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) ซึ่งจะย้ายหมู่เมทิลจาก S-adenosylmethionine (SAM) มาเติมยังเบสไซโตซีน ส่งผลให้โครงสร้างของ SAM มีการเปลี่ยนแปลงมาอยู่ในรูป S-adenosylhomosteine (SAH) (รูปที่ 2.1) (Koukoura et al., 2014)



รูปที่ 2.1 การทำงานของเอนไซม์ DNMTs ทำหน้าที่ย้ายหมู่เมทิลจาก SAM แล้วนำมาเติมที่เบสไซโตซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีน ทำให้ SAM เปลี่ยนเป็น SAH

(ที่มา:https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/335/4262965/PMC4262965_ACAMC-14-1121_F1.png)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมักเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เบสไซโตซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีน โดยจะเรียกบริเวณดังกล่าวว่า CpG island ซึ่ง CpG island มักจะอยู่บริเวณโปรโมเตอร์ (รูปที่ 2.2) โดยการเติมหมู่เมทิลจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชัน โดยไฮเปอร์เมทิลเลชันจะเป็นการเติมหมู่เมทิลมากกว่าปกติส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนน้อยลง เนื่องจาก Methyl-CpG-binding protein (MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 และ KAISO) จะเข้ามาจับบริเวณ 5-methyl cytosine ทำให้ transcription factor ไม่สามารถเข้ามาจับในบริเวณดังกล่าวได้ ทำให้บริเวณดังกล่าวไม่เข้าสู่กระบวนการถอดรหัส โดยจะตรงข้ามกับไฮโปเมทิลเลชันซึ่งเป็นการเติมหมู่เมทิลที่น้อยกว่าปกติส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนมากกว่าปกติ (Koukoura et al., 2014)



รูปที่ 2.2 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณ CpG island มากกว่าปกติส่งผลให้ยีนไม่มีการแสดงออก โดยวงกลมสีขาวแทนตำแหน่ง CpG ที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในขณะที่วงกลมสีเทาแทนตำแหน่ง CpG ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

(ที่มา:http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/images/methylation1.png)

Methylation-Specific PCR (MSP)

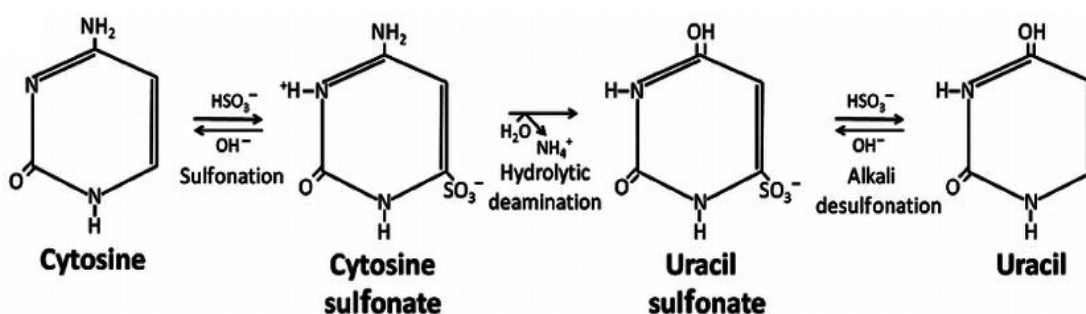
การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนยีนมีหลากหลายวิธีการ หนึ่งในวิธีการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบนยีนที่ต้องการศึกษา คือ วิธี MSP โดยนิยมใช้วิธีดังกล่าว เมื่อต้องการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนแต่ละยีน (Davidović et al., 2014)

การตรวจสอบด้วยวิธี MSP ต้องอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) สำหรับการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จำนวนสองคู่ คือ ไพรเมอร์ที่จับกับตำแหน่ง CpG ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 1 คู่ และไพรเมอร์ที่จับกับตำแหน่ง CpG ที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 1 คู่ (Davidović et al., 2014) ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีการดังกล่าวจะต้องนำดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาทำ bisulfite conversion ก่อน จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion มาทำ PCR กับไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อไป (Ku et al, 2009)

bisulfite conversion เป็นการเติมโซเดียมไบซัลไฟท์ (sodium bisulfite) ลงในดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งส่งผลให้เบสไซโตซีนที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล ในขณะที่เบสไซโตซีนที่มีการเติมหมู่เมทิลจะไม่เกิดปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟท์ ทำให้เบสไซโตซีนดังกล่าวยังคงเป็นเบสไซโตซีนอยู่เช่นเดิม (Patterson et al., 2011)

โซเดียมไบซัลไฟท์จะทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ โดยจะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ sulfonation, hydrolytic deamination และ alkali desulfonation โดย sulfonation จะเป็นขั้นตอนที่ไบซัลไฟท์เข้าไปทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของเบสไซโตซีนได้ผลิตภัณฑ์เป็น cytosine sulfonate ต่อมาจึงเกิด hydrolytic deamination ทำให้ cytosine sulfonate กลายเป็น uracil sulfonate แล้วจากนั้นจะมีการนำหมู่ sulfonate ออกด้วย alkali conversion ทำให้ได้เป็นเบสยูราซิล ซึ่งจะเรียกขั้นตอนนี้ว่า alkali Desulfonation (รูปที่ 2.3) (Patterson et al., 2011)



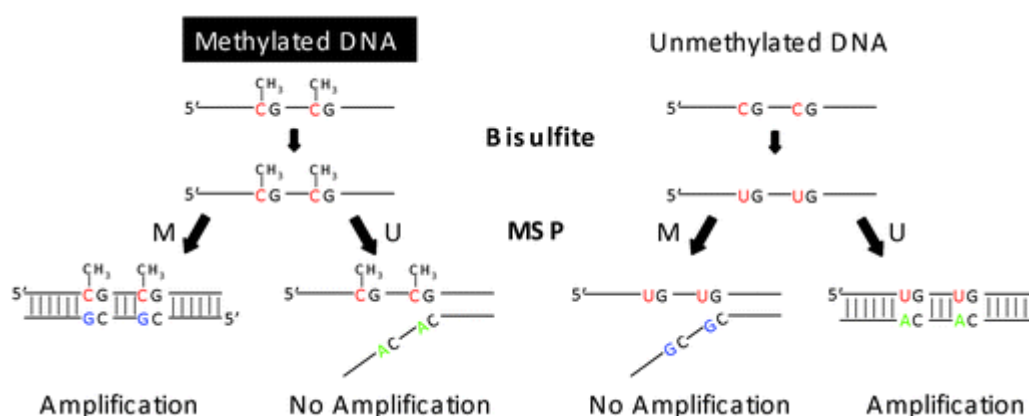
รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการ bisulfite conversion โดยโซเดียมไบซัลไฟท์ จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของเบสไซโตซีน ส่งผลให้เบสไซโตซีนดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเบสยูราซิล

(ที่มา: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/55/8/1471.long>)

การออกแบบไพรเมอร์

วิธี MSP จะใช้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวนสองคู่ ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองคู่จะจับกับไพรโมเตอร์ในตำแหน่งเดียวกัน โดยไพรเมอร์คู่แรกจะจับกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตำแหน่งที่ต้องการจะตรวจสอบ ในขณะที่ไพรเมอร์อีกคู่จะจับกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตำแหน่งที่ต้องการจะตรวจสอบ (Davidović et al., 2014)

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จะออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนที่ต้องการจะศึกษามาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวจะต้องคำนึงว่าเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion มาแล้วหรือไม่ จากนั้นเลือกออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่สนใจ และมี CpG มาก โดยมีเงื่อนไขว่าภายในไพรเมอร์ที่ออกแบบจะต้องมีเบสกวานีนอย่างน้อย 1 ตำแหน่งที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดการจับกับเบสไซโตซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีน (CG) ได้ และในการออกแบบไพรเมอร์อีกคู่ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบจะอยู่ตำแหน่งเดียวกับไพรเมอร์คู่แรก แต่แตกต่างกันที่ภายในไพรเมอร์จะไม่มีเบสกวานีน เนื่องจากเบสไซโตซีนทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นเบสไทมีนตามเงื่อนไขของการทำ bisulfite conversion (รูปที่ 2.4) (Li and Dahiya, 2002)



รูปที่ 2.4 ดีเอ็นเอที่เกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันและไม่เกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เมื่อนำไปผ่านกระบวนการ bisulfite conversion แล้วตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธี MSP จะให้ผลที่แตกต่างกัน คือ ดีเอ็นเอที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะจำเพาะกับ methylation primer ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะจำเพาะกับ unmethylation primer โดย M ย่อมาจาก methylation primer และ U ย่อมาจาก unmethylation primer (ที่มา: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleHtml/2009/LC/b821780g>)

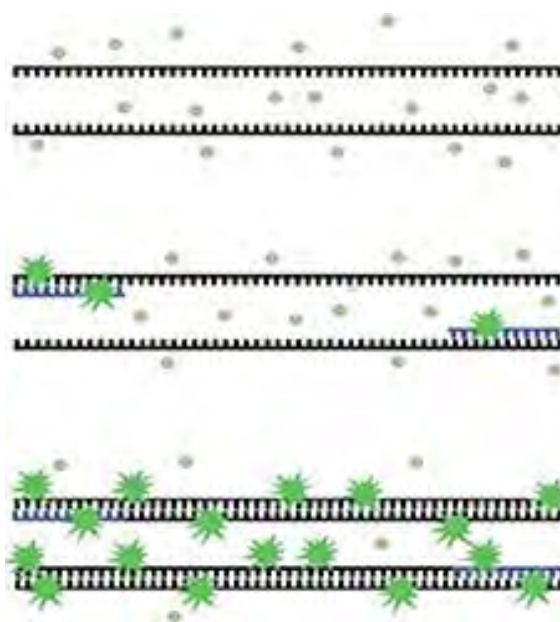
การตรวจสอบด้วย real-time PCR

real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR โดยการทำงานของ real-time PCR จะมีความคล้ายคลึงกับเทคนิค PCR แตกต่างเพียงแค่การทำ PCR จะต้องนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิลิกโทรโฟรีซิส ในขณะที่ real-time PCR สามารถดูปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ทันทีโดยไม่ต้องนำไปตรวจสอบด้วยเจลอิลิกโทรโฟรีซิส โดยเทคนิค real-time

PCR จะแสดงผลในรูปแบบของ Cycler time (C_t) ซึ่งเป็นจำนวนรอบในการทำ PCR ที่ต่ำที่สุดที่เครื่อง real-time สามารถตรวจจับปริมาณสารเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น และผ่านค่า threshold การหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างจะตรวจสอบโดยการสร้างกราฟ standard curve ขึ้น ซึ่งใช้ข้อมูลผลการทดลองระหว่างดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นกับไซเคิลที่ต้องการทดสอบ หลังจากได้ผลการทดลองจะสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ กับค่า C_t ที่ได้จากการทดลอง แล้วจึงนำมาสร้างสมการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Loftis and Reeves, 2012)

SYBR[®] Green

เทคนิค real-time PCR จะต้องมีสารเรืองแสงลงไป เพื่อให้เครื่อง real-time สามารถตรวจจับปริมาณของดีเอ็นเอที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่ง SYBR[®] Green จัดเป็นหนึ่งในสารเรืองแสงที่ใช้ในการตรวจสอบ โดย SYBR[®] Green จะเข้าไปจับที่พันธะไฮโดรเจนของดีเอ็นเอสายคู่ และตรวจสอบได้จากการเรืองแสงของ SYBR[®] Green ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (รูปที่ 2.5) ทำให้ มีการเรืองแสง เครื่อง real-time จึงตรวจจับปริมาณของดีเอ็นเอสายคู่ที่เพิ่มขึ้นได้ และแสดงผลในรูปแบบของ Cycler time (C_t) (Loftis and Reeves, 2012)



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของ SYBR[®] Green ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับพันธะไฮโดรเจนของดีเอ็นเอสายคู่ และเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

(ที่มา: <http://www.afriqip.org/sites/default/files/images%20for%20fact%20sheets/molbiol-img02.jpg>)

การตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

การตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยามีหลายวิธี โดยหนึ่งในวิธีการตรวจสอบ คือ Hematoxylin and eosin stain (H&E) จัดเป็นวิธีการย้อมสีที่นิยมมากในการทดสอบทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นการย้อมโดยใช้สีย้อม 2 สี คือ hematoxylin และ eosin โดยสีย้อม hematoxylin จะย้อมนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน ในขณะที่สีย้อม eosin จะย้อมไซโทพลาสซึมติดสีชมพู โดยการย้อมสีขึ้นเนื้อด้วยวิธี H&E นิยมใช้มากในการตรวจสอบชิ้นเนื้อเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็ง (Chan, 2014) ซึ่งจะใช้ในการประเมินร่วมกับการตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อรังไข่ที่ถูกแช่ในฟอร์มาลินจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่ และกลุ่มบุคคลที่มีรังไข่ปกติ โดยเป็นตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ 30 ตัวอย่าง แต่มีเพียง 26 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ประเภทเยื่อบุผิวรังไข่ (epithelial ovarian cancer) และกลุ่มบุคคลที่มีรังไข่ปกติ 20 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดได้รับมาจากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอกสารรับรองโครงการวิจัยเลขที่ IRB no. 396/59

วัสดุอุปกรณ์

- DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, USA)
- Mastercycler pro S (Eppendorf, Germany)
- QuantiStudio 6 Flex (Life technologies, USA)
- Mini Plate Spinner MPS 1000 (Labnet, USA)
- Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ (Bio-Rad, USA)
- Image Lab[™] Softwar (Bio-Rad, USA)
- Universal 320 R (Hettich Zentrifugen, Germany)
- Enduro[™] Power Supplies 300V (Labnet, USA)
- Vortex Genie 2 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- NanoDrop[™] (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Micropipette (Gilson, France)
- Pipette tip
- 96 well-plate
- CO₂ incubators (Shel lab, USA)
- Laminar flow cabinet (Gelman sciences, Singapore)
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (Sri Trang Gloves, Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง
 - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma-Aldrich, Germany)
 - Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
 - Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
 - Lysis buffer ประกอบด้วย
 - 5M NaCl
 - 0.5M EDTA pH 8.0
 - Distilled water
 - 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Calbiochem, Japan)
 - Proteinase K (Giproan Protein Engineering, Inc., China)
 - Phenol-Chloroform : Isoamyl Alcohol (Sigma-Aldrich, Germany)
 - 10M $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$ (Merck, Germany)
 - Glycogen (Sigma-Aldrich, Germany)
 - 70% และ 100% Ethanol (Merck, Germany)
3. สารเคมีที่ใช้ในการทำ bisulfite conversion
 - ชุดคิท EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp., USA)
4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
 - 2x SensiFAST™ SYBR Lo-ROX Mix (Bioline, UK)
 - 20uM Forward primer และ 20uM Reverse primer
 - Distilled water
 - Epiect® PCR Control DNA Set (Qiagen, Germany)
5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 40% Acrylamide/Bis Solution 19:1 (Bio-Rad, USA)
 - OmniPur® TEMED (Merck, Germany)
 - 1X และ 10X TBE ประกอบด้วย
 - Tris (Affymetrix, USA)
 - Boric acid (Affymetrix, USA)
 - 0.5M EDTA (Affymetrix, USA)
 - 10% Ammonium persulfate (APS) (Merck, German)

- 6X bromophenol blue loading dye (Fermentas International Inc., Canada)
- 25 bp DNA ladder (New England Biolab, USA)
- SYBR[®] Green (Bio-Rad, USA)

วิธีดำเนินการ

การออกแบบไพรเมอร์ตามวิธีการ MSP

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณไพรโมเตอร์และเอ็กซอนที่ 1 ของ ยีน *STK38* ด้วยวิธี MSP (Davidović et al., 2014) โดยจะออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มี CpG มาก และเป็นบริเวณข้างเคียงกับตำแหน่ง cg02964385 (ฟาติมา ตีบทา, 2560) สำหรับ Methylation beta-actin primer (ตารางที่ 3.1) ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ 713 ห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ของมะเร็ง และโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย (Angsuwatcharakon et al., 2016)

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบส และ PCR product ของ Methylation beta-actin primer

primer	primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	T _m (°C)
Forward methylation beta-actin	5' GTGTATTTGATTTTGGAGGAGA 3'	102	54.7
Reverse methylation beta-actin	5' CCTTAATACCAACCTACCCAA 3'		57.5

ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์

ค้นหาลำดับเบสบริเวณที่มีตำแหน่ง CpG ที่ใช้ในการศึกษา โดยเปรียบเทียบจากงานวิจัยของนายฟาติมา ตีบทา (2560) ออกแบบไพรเมอร์เป็นไปตามเงื่อนไขของวิธี MSP (Li and Dahiya, 2002) ตรวจสอบขนาดความยาวของไพรเมอร์ ค่า melting temperature (T_m) และปริมาณสัดส่วนเบสไซโตซีน กับเบสกวานีน (GC content) ของไพรเมอร์ผ่าน <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

การตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการ paraffin-embedded tissue ซึ่งจะอยู่ในรูปของ paraffin block ส่งไปยังฝ่ายพยาธิวิทยาเพื่อย้อมสี H&E ตามวิธีการของ Assanasan et al. (2004) จากนั้นนำ มาประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ ซึ่งใช้ผู้ประเมินทั้งหมดจำนวน 3 คนที่ผ่านการอบรมแล้วทำการประเมินผลร่วมกัน จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณร่วมกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการคำนวณจากสมการที่ถูกรังจากรัง unmethylation standard curve แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี unpaired t-test โดยหากค่า p มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อกัน (George and Mallery, 2016)

การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งรังไข่ชนิด OVISE จะเป็นตามวิธีการเลี้ยงเซลล์ของห้องปฏิบัติการ อนุพันธุศาสตร์ของมะเร็ง และโรคของมนุษย์ โดยเลี้ยงเซลล์ในพลาสติกขนาด 25 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์จนเซลล์มีการเจริญเติบโต ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมด ปิดเต้าอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากพลาสติกแล้วจึงเติมสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดเต้าสารละลาย PBS ให้ทั่วพลาสติกจากนั้นจึงเปิดเต้าสารละลายออก ใส่สารละลาย Trypsin-EDTA ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดเต้าสารละลายภายในพลาสติกปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองใหม่เพื่อนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ในขณะที่สารละลายที่เหลือภายในพลาสติก ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรจะเติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อนำมาเลี้ยงเซลล์ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล – คลอโรฟอร์มแบบมาตรฐาน (Butler, 2012) โดยในขั้นตอนสุดท้ายจะละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจะนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) โดยค่าสัดส่วน OD_{260}/OD_{280} ที่ประมาณ 1.8

จะแสดงถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (Desjardins and Conklin, 2010) และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป

การทำ bisulfite conversion

เจือจางดีเอ็นเอตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ bisulfite conversion โดยใช้ชุดคิท EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp., USA) ร่วมกับ DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, USA) ตามวิธีของบริษัท และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR

ทำ gradient PCR เพื่อหาความเหมาะสมสำหรับการทดลอง โดย PCR ประกอบด้วย ขั้น pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้น denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 10 วินาที ขั้น extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และขั้น post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยในขั้น denature annealing และ extension จะมีจำนวน 40 รอบ

กำหนดให้ความเข้มข้นของ forward primer และ reverse primer ที่ต้องการทดสอบคือ 10 ไมโครโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร และ 0.4 ไมโครลิตร ตามลำดับ กำหนดช่วงของอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing ของ unmethylation primer และ methylation primer อยู่ในช่วง 54-62 องศาเซลเซียส ในขณะที่ช่วงของอุณหภูมิสำหรับ methylation beta-actin primer คือ 59-62 องศาเซลเซียส สำหรับ bisulfite DNA ที่จะนำมาใช้ในขั้นตอน gradient PCR คือดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ OVISE โดยมี unmethylation Human DNA 100% (Unmet 100%) จาก Epitect® PCR Control DNA Set (Qiagen, Germany) เป็น Positive control สำหรับการทดสอบ unmethylation primer และ methylation beta-actin primer ในขณะที่ใช้ methylation Human DNA 100% (Met 100%) จาก Epitect® PCR Control DNA Set (Qiagen) เป็น Positive control สำหรับการทดสอบ methylation primer ส่วน blank จะเป็น master mix ของแต่ละไพรเมอร์ที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

การตรวจสอบ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำ PCR product ผสม 6X bromophenol blue loading dye (Fermentas International Inc., Canada) ปริมาณ 3 ไมโครลิตร และใช้ 25 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc., USA) เจลที่ใช้ คือ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8% (w/v) ใน 1X TBE ที่กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร SYBR[®] Green (Bio-Rad, USA) เป็นเวลา 30 นาที บันทึกผลด้วย gel documentation

การสร้าง unmethylation standard curve

ใส่ master mix ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เหมาะสมกับการทดลอง ลงใน 96 well-plate หลุมละ 19 ไมโครลิตร ใส่ดีเอ็นเอที่จะใช้ทดลอง คือ Unmet 100% ที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion แล้ว มาเจือจาง 10 เท่า เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 10 1 0.1 0.01 และ 0.001 ไมโครโมลาร์ แล้วไปทดสอบด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้เครื่อง QuantiStudio 6 Flex (Life technologies, USA) ในการทดสอบ ซึ่งจะทำการทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ โดยจะนำ หลังจากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อสร้าง standard curve ระหว่างค่า C_t กับ log ของความเข้มข้นดีเอ็นเอ และคำนวณหาสมการเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตัวอย่าง (Ponchel et al., 2003)

การทำ real-time PCR

เตรียม master mix ที่เหมาะสมกับการทดลอง โดยใส่ master mix ลงใน 96 well-plate หลุมละ 19 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion ในการทดสอบกับไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นจะนำผลการทดลองดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างจากสมการที่สร้างจาก standard curve (Ponchel et al., 2003)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับเบสของยีน *STK38* ที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion (รูปที่ 4.1)

```
GTAATTTTTTAAATTTATGAGAGTTTATTTTATTTTAGGTAAGGTTTTATTTTAAAGGAA
GAGGAGGGGGTTAAGGGTTTTAGTAGATTTGTTTTATACGGGGTAGGGGGTGGGTGGG
AATTATATAGGTGATAATATTTTATAGAATTATATATATATTTATATATACTATATGAT
TGTATATTTAATAGGTTAAATTCGAGTGTGGTTTGTAAATGAAGTTAATTGTATTGGTTTTA
GTTAATTGTATTGGTTTAGTTAATTGTATTGTGCGAATGTTAATTTTTTGGTTTTGAGAA
TGTTGTATTTTAAAGAAAATGTTGAGGTAAGTTGGGTGGGTGATGGTATAGGGAATTTGT
ATGTATTAATTTTTGTAATTTTTTGTGAGTTTATAATTATTTTTCGAAAGTAAAAAGTAAAAATA
AAAGAAAATAATGGAATTTTTTTTTTAGTTTAGTTTATTTTCGAGATCGTTTTATATTTAT
ATATTTGGTTTTATTTAGGTTTAGTTAGTTTTCGAGATCGTTTTATATTTAT
GGGTTACGTAAGCGTAGTTTCGTAATTTTCGGTTCGTTTCGGGAAGTCGCGTATGCGTAGT
TTTCGGTTTTTCGGTTGTCGCGTTAGTTTCGTTTTTCGCGCGGGGGATCGGGTTGTTTTGGTT
TTTTAGCGTTTCGCGTTTTTTTTTCGGTAGTTGGAACGTTTTTTTGGTTGTTTTATTCGTAATT
GTTTGGTTGTTTTTGGTTTTAGAGTTTTTACGCGTTTTTTTTTCGTTTTTGGTTCGTTGGT
TGTCGTCGTCGGGGTTTTCGTTAGTTTTTAAAGTCGAGATTATTGGTTCGAAGGGGCGTTTTGT
GGTTTTTCGTCGTTTTTAGTTTTGTTTTTTTTGGTTTTTCGTGAGTTGTTTGTGTGCGT
CGTTTTTATTTTATTTTCGGGGTTTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTTTTAAATTTTCGATTTTTT
```

รูปที่ 4.1 ลำดับเบสที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion และบริเวณตำแหน่ง cg02964385 ที่ไพรโมเตอร์บนยีน *STK38* โดยตัวอักษรสีเทาแสดงถึงบริเวณไพรโมเตอร์ ตัวอักษรสีแดงแสดงถึงบริเวณเอ็กซอนที่ 1 สีเหลืองแสดงถึงตำแหน่งของ cg02964385 และกรอบสีม่วงแสดงถึงบริเวณอินทรอนที่ 1

(ที่มา: https://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000112079;r=6:36493892-36547479;t=ENST00000229812)

ค้นหาตำแหน่ง CpG ทั้งหมดที่อยู่บริเวณตำแหน่ง cg02964385 (รูปที่ 4.2ก) จากนั้นจึงออกแบบ methylation primer (รูปที่ 4.2ข) ในขณะที่ unmethylation primers จะถูกออกแบบที่ตำแหน่งเดียวกับ methylation primers แต่จะออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (รูปที่ 4.2ค) หลังการออกแบบไพรเมอร์ตามขั้นตอนดังกล่าวจะได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการทดลองจำนวน 2 คู่ (ตารางที่ 4.1)

(ก)

```

GTAATTTTTTAAATTTATGAGAGTTTATTTTATTTTAGGTAAGGTTTTATTTTAAAGGAA
GAGGAGGGGGGTTAAGGGTTTTAGTAGATTTGTTTTATACGGGGTAGGGGGTGGGTGGG
AATTATATAGGTGATAATATTTTATAGAATTATATATATATTTATATATACGTATATGAT
TGTATATTTAATAGGTTAAATTCGAGTGTGGTTTGTAAATGAAGTTAATTGTATTGGTTTA
GTTAATTGTATTGGTTTAGTTAATTGTATTGTGCGAATGTTAATTTTTTGGTTTTGAGAA
TGTGTATTTTAAAGAAAAATGTTGAGGTAAGTTGGGTGGGTGATGGTATAGGGAATTTGT
ATGTATTAATTTTGTAAATTTTTTGTGAGTTTATAAATTATTTCGAAGTAAAAAGTAAAATA
AAAGAAAAATAATGGAATTTTTTTTTTAGTTTAGTTTATTTCGGAGATCGTTTTATATTTAT
ATATTTGGTTTTATTTAGGTTTAGTTAGTTTTAGGTAGGGGGTGAAGGGAGGGGTAGGGT
GGGGTTACGTAAGCGTAGTTTCGTAATTTCGGTCGTTTCGGGAAGTCGCGTATGCGTAGT
TTCGGTTTCGGGTTGTCGCGTTAGTTCGTTTTCGCGCGGGGGATCGGGTTGTTTTGGTT
TTTTAGCGTTCGCGTTTTTTTTCGGTAGTTGGAACGTTTTTTGTTGTTTTATTCGTAATT
GTTTGTGTTTTTTGTTTTAGAGTTTTTTACCGCGTTTTTTTTCGTTTTTGGTTCGTTGGT
TGTCGTCGTCGGGGTTTCGTTAGTTTTTAAAGTCGGAGATTATTGGTCGAAGGGGCGTTTGT
GGTTTTCGTCGTTTTTAGTTTTGTTTTTTTTTGGGTTTTGGTGAGTTGTTTGTGTTCGT
CGTTTTTATTTTATTTCGGGGTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTTTTAAATTTCGATTTTT

```

(ข)

```

GTAATTTTTTAAATTTATGAGAGTTTATTTTATTTTAGGTAAGGTTTTATTTTAAAGGAA
GAGGAGGGGGGTTAAGGGTTTTAGTAGATTTGTTTTATACGGGGTAGGGGGTGGGTGGG
AATTATATAGGTGATAATATTTTATAGAATTATATATATATTTATATATACGTATATGAT
TGTATATTTAATAGGTTAAATTCGAGTGTGGTTTGTAAATGAAGTTAATTGTATTGGTTTA
GTTAATTGTATTGGTTTAGTTAATTGTATTGTGCGAATGTTAATTTTTTGGTTTTGAGAA
TGTGTATTTTAAAGAAAAATGTTGAGGTAAGTTGGGTGGGTGATGGTATAGGGAATTTGT
ATGTATTAATTTTGTAAATTTTTTGTGAGTTTATAAATTATTTCGAAGTAAAAAGTAAAATA
AAAGAAAAATAATGGAATTTTTTTTTTAGTTTAGTTTATTTCGGAGATCGTTTTATATTTAT
ATATTTGGTTTTATTTAGGTTTAGTTAGTTTTAGGTAGGGGGTGAAGGGAGGGGTAGGGT
GGGGTTACGTAAGCGTAGTTTCGTAATTTCGGTCGTTTCGGGAAGTCGCGTATGCGTAGT
TTCGGTTTCGGGTTGTCGCGTTAGTTCGTTTTCGCGCGGGGGATCGGGTTGTTTTGGTT
TTTTAGCGTTCGCGTTTTTTTTCGGTAGTTGGAACGTTTTTTGTTGTTTTATTCGTAATT
GTTTGTGTTTTTTGTTTTAGAGTTTTTTACCGCGTTTTTTTTCGTTTTTGGTTCGTTGGT
TGTCGTCGTCGGGGTTTCGTTAGTTTTTAAAGTCGGAGATTATTGGTCGAAGGGGCGTTTGT
GGTTTTCGTCGTTTTTAGTTTTGTTTTTTTTTGGGTTTTGGTGAGTTGTTTGTGTTCGT
CGTTTTTATTTTATTTCGGGGTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTTTTAAATTTCGATTTTT

```

รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *STK38* บริเวณ โพรโมเตอร์และเอ็กซอนที่ 1 (ก) บริเวณตำแหน่ง cg02964385 และตำแหน่ง CpG บริเวณ ไกล่เคียงบนยีน *STK38* ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและผ่านกระบวนการ bisulfite conversion โดย บริเวณสีเหลืองจะแสดงถึงตำแหน่งของ cg02964385 และสีฟ้าแสดงถึงตำแหน่ง CpG ทั้งหมดที่ พบ (ข) methylation primer ของยีน *STK38* ที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและผ่านกระบวนการ bisulfite conversion โดยสีเขียวแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะไปจับ

(ค)

```

GTAATTTTAAATTTATGAGAGTTATTTTATTTTAGGTAAGGTTTATTTTAAAGGAA
GAGGAGGGGGGTTAAGGGTTTTAGTAGATTTGTTTTATATGGGGTAGGGGGTGGGTGGG
AAT TATATAGGTGATAATATTTTATAGAATTATATATATATTTATATATATGTATATGAT
TGTATATTTAATAGGTTAAATTTGAGTGTGGTTTGTAAATGAAGTTAATTGTATTGGTTTA
GTTAATTGATTTAGTTAATTTAGTTAATTTAGTTAATTTAGTTAATTTAGTTAATTTAGTTA
TGTGTATTTTAAAGAAAAATGTTGAGGTAAGTTGGGTGGGTGATGGTATAGGGAATTTGT
ATGTATTAATTTTGAATTTTGTGAGTTTATAATTATTTTGAAGTAAAAAGTAAAATA
AAAGAAAAATAATGGAATTTTTTTTTTAGTTTAGTTTATTTTGAAGTTGTTTTATATTTAT
ATATTTGGTTTTATTTAGGTTTAGTTAGTTT TAGGTAGGGGGTGAAGGGAGGGGTAGGGT
GGGTTATGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGGTT
TTTGGTTTTGGGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
TTTTAGTTGTTTTGTTTTTTTTGGTAGTTGGAATGTTTTTTGTTGTTTTATTTGTAATT
GTTTGTGTTTTTGTGTTTAGAGTTTTTATGTGTTTTTTTTGTTTTTGGTTTTGTTGGT
TGTGTTGTTGGGTTTTGTTAGTTTTAAGTTGAGATTATGGTTGAAGGGGTGTTTGT
GGTTTTTGTGTTTTAGTTTTGTTTTTTTTGGGTTTTGTTGAGTTGTTGTTGTTGTTGTT
TGTTTTTATTTATTTTGGGGTTTTTTTTTATTTTTTTTTTAAATTTTGATTTTT

```

รูปที่ 4.2 (ต่อ) การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *STK38* บริเวณไพรโมเตอร์และเอ็กซอนที่ 1 (ค) unmethylation primer ของยีน *STK38* ที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและผ่านกระบวนการ bisulfite conversion โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้สีดำแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะไปจับ และสีเขียวคือบริเวณที่ methylation primer จะเข้าไปจับ

ตารางที่ 4.1 ลำดับเบส และ PCR product ของ methylation *STK38* primer และ unmethylation *STK38* primer

primer	primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Tm (°C)
forward methylation <i>STK38</i>	5' TAAGCGTAGTTTCGTAATTC 3'	117	53.4
reverse methylation <i>STK38</i>	5' YTA AAAAACCAAAACAACCCG 3'		53.4
forward unmethylation <i>STK38</i>	5' RGTAAGTGTAGTTTTGTAATTTT 3'	121	53.9
reverse unmethylation <i>STK38</i>	5' RARTAAAAACCAAAACAACCCA 3'		53.9

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่อยู่ในรูปของ paraffin block ของบุคคลที่มีรังไข่ปกติมีทั้งหมด 15 ตัวอย่าง และตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง พบเพียง 13 ตัวอย่างเท่านั้น เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อในรูป paraffin block บางตัวอย่างเกิดการสูญหายไประหว่างการเคลื่อนย้ายจากที่จับเก็บเดิมไปสู่ที่จัดเก็บใหม่ โดยจะนำตัวอย่างทั้งหมดมาประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์

samples	บริเวณที่เป็นมะเร็งต่อพื้นที่ชิ้นเนื้อทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	อัตราส่วน
OC12	60	0.60
OC13	50	0.50
OC14	45	0.45
OC20	15	0.15
OC21	80	0.80
OC22	20	0.20
OC25	35	0.35
OC71	45	0.45
OC72	70	0.70
OC73	90	0.90
OC75	85	0.85
OC76	85	0.85
OC77	15	0.15

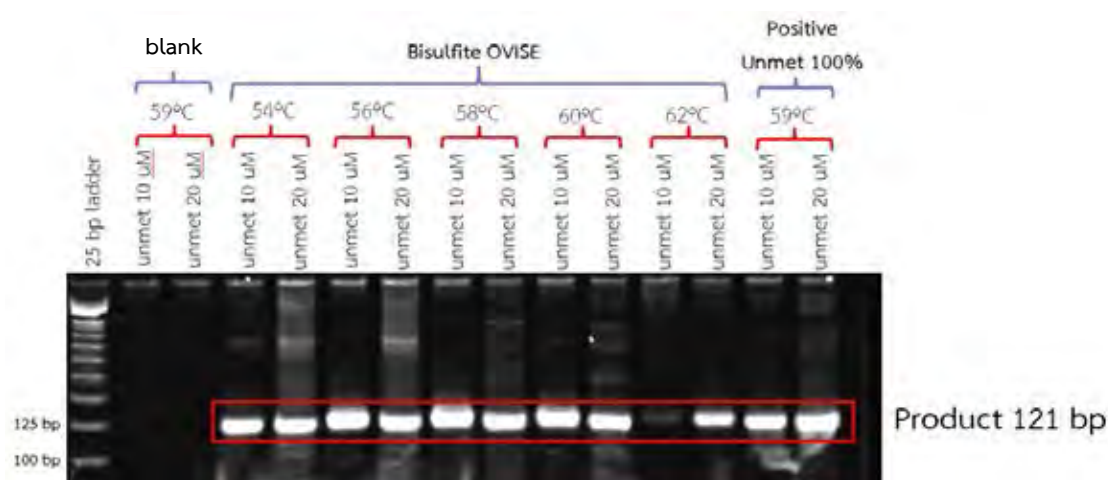
ผลการสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอจะตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเครื่อง NanoDrop พบว่าดีเอ็นเอทุกตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนแสง OD_{260}/OD_{280} อยู่ในช่วง 1.7-1.9 และความเข้มข้นอยู่ในช่วง 200-900 นาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร

ผลกระบวนการ gradient PCR

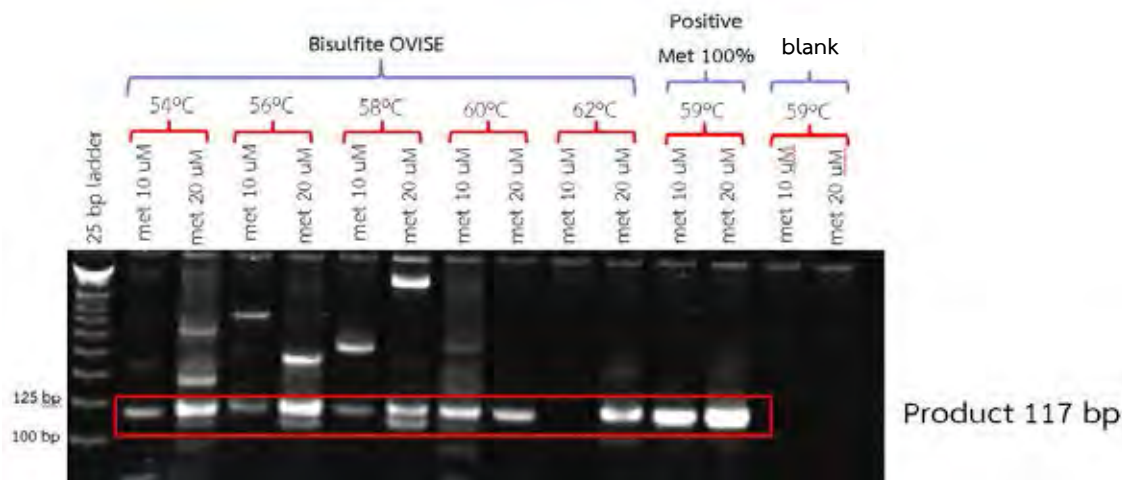
การตรวจสอบด้วยเทคนิค real-time PCR นั้น ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปตรวจสอบพร้อมกันด้วย 96 well-plate เพื่อลดความผิดพลาดทางเทคนิค ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ควรมีอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน annealing เท่ากัน เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลิเล็กโทรโฟรีซิส โดยจะพิจารณาจาก PCR product ที่ได้ต้องมีขนาดถูกต้อง และแถบดีเอ็นเอขึ้นสีเข้ม ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมคือ 20 ไมโครโมลาร์ โดย unmethylation primer มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับขั้นตอน annealing คือ 62 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.3ก) ในขณะที่ methylation primer มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับขั้นตอน annealing คือ 60 และ 62 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.3ข) ส่วน methylation beta-actin primer จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับขั้นตอน annealing คือ 59 ถึง 62 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.3ค) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าในการทำการทดลองครั้งนี้จะใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 20 ไมโครโมลาร์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing คือ 62 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมกับทั้ง 3 ไพรเมอร์

(ก)

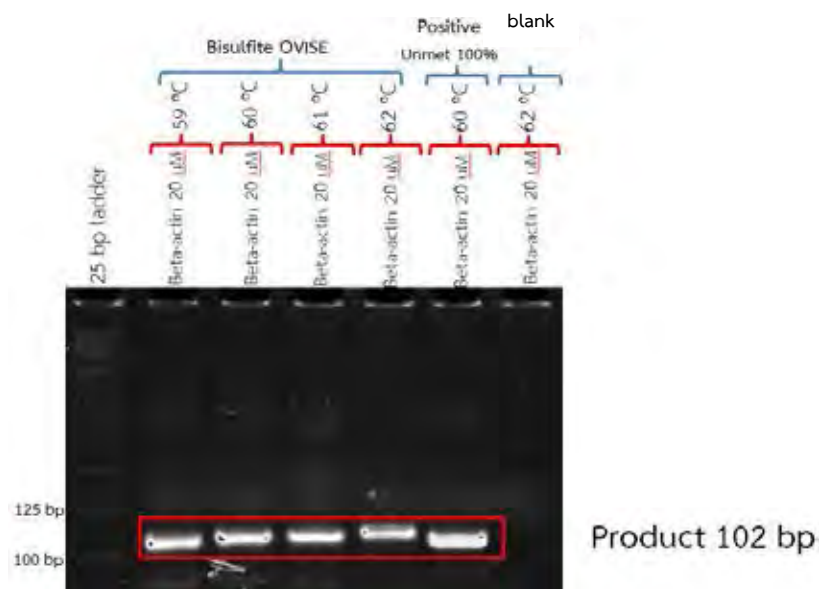


รูปที่ 4.3 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของยีน *STK38* และ *beta-actin* ด้วยกระบวนการ gradient PCR (ก) ผลการทำ gradient PCR ของ unmethylation primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ ช่วงอุณหภูมิ 54-62 องศาเซลเซียส

(ข)



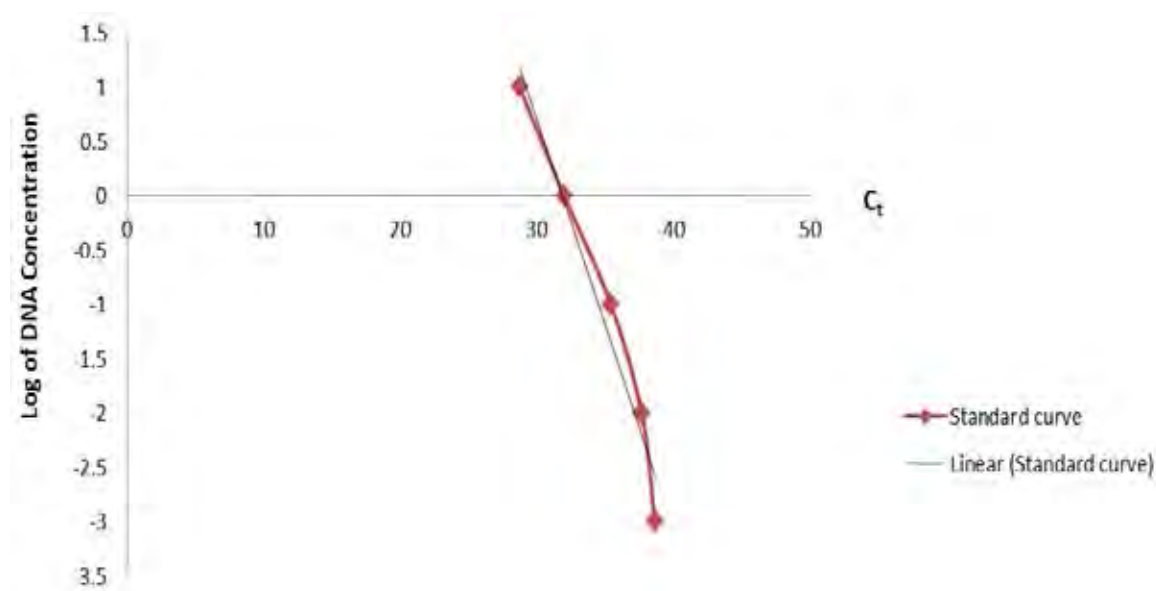
(ค)



รูปที่ 4.3 (ต่อ) ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของ *STK38* และ *beta-actin* ด้วยกระบวนการ gradient PCR (ข) ผลการทำ gradient PCR ของ methylation primer ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ ช่วงอุณหภูมิ 54-62 องศาเซลเซียส (ค) ผลการทำ gradient PCR ของ methylation beta-actin primer ที่ช่วงอุณหภูมิ 59-62 องศาเซลเซียส

ผลการสร้าง unmethylation standard curve

หลังจากได้ผลการทดลองจะสร้างกราฟระหว่าง C_t กับ Log ของความเข้มข้นของ Unmethylation Human DNA 100% จากนั้นจึงสร้างสมการที่มีความสอดคล้องกับลักษณะของกราฟที่สร้างได้ (รูปที่ 4.4)



$$Y = -0.3767X + 11.99$$

$$R^2 = 0.9617$$

รูปที่ 4.4 unmethylation standard curve และสมการความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดย Y คือ Log ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และ X คือค่า C_t

สมการที่ได้จาก unmethylation standard curve จะถูกนำมาใช้เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งจากการสร้างกราฟระหว่าง Log ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ กับค่า C_t จะได้สมการเส้นตรง คือ $Y = -0.3767X + 11.99$ ซึ่งมีค่า $R = 0.9617$ โดย Y คือ Log ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และ X คือค่า C_t โดยในการคำนวณ X จะถูกแทนค่าด้วยผลต่างระหว่างค่า C_t จาก unmethylation primer กับค่า C_t จาก methylation beta-actin primer เพื่อให้ได้เฉพาะค่า C_t ของยีน STK38 เพียงอย่างเดียว

ผลการทดสอบด้วย real-time PCR

จากการทดสอบด้วย unmethylation primer ดีเอ็นเอตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ (OC) ที่ตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 23 ตัวอย่าง และที่ไม่สามารถตรวจสอบค่า C_t ได้ (undetermined) จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของ OC คือ 32.94 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 4.32 ในขณะที่ดีเอ็นเอตัวอย่างของบุคคลที่มีรังไข่ปกติ (NO) ที่ตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 15 ตัวอย่าง และที่ไม่สามารถตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของ NO คือ 32.65 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 2.51 รวมทั้งไม่พบการปนเปื้อนของ master mix ใน blank (ตารางที่ 4.3)

จากการทดสอบด้วย methylation primer ดีเอ็นเอตัวอย่างของ OC ที่ตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง และที่ไม่สามารถตรวจสอบค่า C_t ได้ (undetermined) จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของ OC คือ 32.18 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 1.06 ในขณะที่ดีเอ็นเอตัวอย่างของ NO ที่ตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 4 ตัวอย่าง และที่ไม่สามารถตรวจสอบค่า C_t ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของ NO คือ 31.74 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 1.59 รวมทั้งไม่พบการปนเปื้อนของ master mix ใน blank (ตารางที่ 4.3)

จากการทดสอบด้วย methylation beta-actin primer พบว่าค่าเฉลี่ย C_t ของ OC คือ 33.74 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 4.28 ในขณะที่ค่าเฉลี่ย C_t ของ NO คือ 31.80 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 3.26 รวมทั้งไม่พบการปนเปื้อนของ master mix ใน blank (ตารางที่ 4.3)

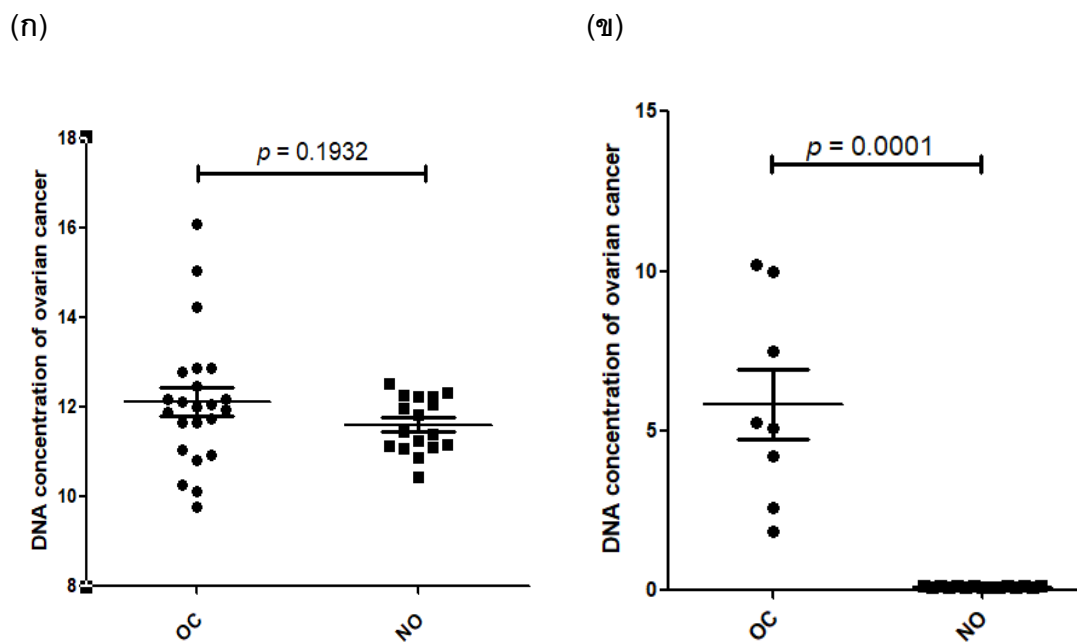
นำค่า C_t ที่ได้จาก unmethylation primer มาแทนค่าในสมการที่ (รูปที่ 4.4) เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ผลร่วมกับอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ (ตารางที่ 4.4) โดยตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลจะเป็นตัวอย่างที่ผ่านการย้อมด้วย H&E เท่านั้น จากนั้นจึงนำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติซึ่งจะสร้างทั้งหมด 2 กราฟ โดยกราฟแรกจะเป็นดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ คือ OC ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง และ NO ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยจะใช้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการเปรียบเทียบ (รูปที่ 4.5ก) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย unpaired t-test พบว่า p มีค่า 0.1932 ในขณะที่อีกกราฟจะใช้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ผลร่วมกับอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ ดังนั้นจึงมี OC ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง และ NO ทั้งหมด 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล (รูปที่ 4.5ข) วิเคราะห์ทางสถิติด้วย unpaired t-test พบว่า p มีค่า 0.0001

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า C_t จากดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่

primer	samples	mean \pm s.d.
unmethylation primer	OC	32.94 \pm 4.32
	NO	32.65 \pm 2.51
methylation primer	OC	32.18 \pm 1.06
	NO	31.74 \pm 1.59
Methylation beta-actin primer	OC	33.74 \pm 4.28
	NO	31.80 \pm 3.26

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ และอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ด้วยวิธีการย้อม H&E

samples	ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	อัตราส่วน	ผลคูณระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอ กับอัตราส่วน
OC	0.26 \pm 2.16	11.89 \pm 0.81	0.53 \pm 0.27	5.82 \pm 3.14
NO	0.87 \pm 1.50	11.66 \pm 0.57	0.01 \pm 0.00	0.11 \pm 0.01



รูปที่ 4.5 กราฟค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติ โดยสัญลักษณ์วงกลมคือผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และสัญลักษณ์สี่เหลี่ยมคือบุคคลที่มีรังไข่ปกติ (ก) ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากสมการ (ข) ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้มาจากสมการร่วมกับสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ โดยสัญลักษณ์วงกลมคือผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และสัญลักษณ์สี่เหลี่ยมคือบุคคลที่มีรังไข่ปกติ

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผล

อภิปรายผลการทดลอง

โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นการนำโครงการวิทยาศาสตร์ของ นายฟาติมา ตีบทา (2560) มาศึกษาต่อ พบว่าการเกิดไฮโปเมทิลเลชันที่ยีน STK38 บริเวณ CpG ที่ตำแหน่ง cg02964385 ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (ฟาติมา ตีบทา, 2560) และตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีนดังกล่าวด้วยวิธี COBRA แต่โครงการวิทยาศาสตร์นี้จะตรวจสอบด้วยวิธี MSP ร่วมกับการตรวจสอบด้วย real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบผลการทำ PCR ได้ทันที

การออกแบบไพรเมอร์ในการทดลองจะเลือกออกแบบบริเวณที่มี CpG เป็นจำนวนมาก โดยสาเหตุที่ไม่สามารถเลือกตำแหน่ง cg02964385 มาเป็นส่วนหนึ่งของไพรเมอร์ได้ เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวมี CpG อยู่บ่อย และ CpG ที่ใกล้ที่สุดอยู่ค่อนข้างไกลซึ่งไม่เหมาะสมต่อการออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี MSP เท่าที่ควร ดังนั้นจึงเลือกออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่อยู่ถัดออกมาจากตำแหน่งดังกล่าว คือ บริเวณระหว่างไพรโมเตอร์ และเอ็กซอนที่ 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มี CpG จำนวนมาก หลังจากทำการออกแบบ unmethylation primers และ methylation primers โดยคำนึงว่า melting point (T_m) ของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ควรมีค่าเท่ากัน หรือใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการทดลอง (ตารางที่ 4.1)

การทดสอบด้วย real-time PCR จะได้ผลการทดลองเป็นค่า C_t ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกนำมาตรวจสอบกับไพรเมอร์แต่ละคู่ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอตัวอย่างบางตัวอย่าง เมื่อนำไปทดสอบด้วย real-time PCR จะพบว่าค่า C_t ที่ได้ถูกรายงานว่า undetermined จากการวิเคราะห์ผลของเครื่อง QuantiStudio 6 Flex (Life technologies, USA) ซึ่งค่า C_t ที่ผลเป็น undetermined นั้นอาจเป็นผลมาจากการที่เครื่องไม่สามารถตรวจจับปริมาณดีเอ็นเอหลังจากครบจำนวนรอบของ PCR แล้ว (Goni, Garcia and Fosisac, 2009) จากผลการทดลองระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่าง และ unmethylation primer พบว่าดีเอ็นเอตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง มี 23 ตัวอย่างที่มีการตรวจพบปริมาณการเรืองแสงของ SYBR[®] Green และดีเอ็นเอตัวอย่างของบุคคลที่มีรังไข่ปกติจากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง มี 15 ตัวอย่างที่มีการตรวจพบปริมาณการเรืองแสงของ SYBR[®] Green ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบด้วย real-time PCR มีความรวดเร็วมากกว่าการตรวจสอบด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากสามารถดูผลการทดลองได้ในทันที

หลังจากการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR จะนำค่า C_t ที่ได้จากการทดลองมาใช้ในการวิเคราะห์ผล โดยในการทดสอบระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่าง และ methylation beta-actin primer จะเป็นการทดสอบเพื่อตรวจสอบว่าดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นมากพอสำหรับการทดสอบ และให้ความสนใจกับผลการทดลองระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่าง และ unmethylation primer มากกว่า เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน *STK38* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ จากการวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการแทนค่า C_t ในสมการ และนำมาสร้างกราฟ (รูปที่ 4.5ก) พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และดีเอ็นเอตัวอย่างของบุคคลที่มีรังไข่ปกติไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ หรืออาจออกแบบไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง cg02964385 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งรังไข่ (ฟาติมา ตีบทา, 2560)

การวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างร่วมกับการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ และนำมาสร้างกราฟ (รูปที่ 4.5ข) โดยดีเอ็นเอตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาวิเคราะห์ผลนั้นจะเป็นดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีด้วยวิธีการย้อม H&E ซึ่งจากการทดลองพบว่า การทดสอบระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่าง และ methylation primer ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ผลร่วมกับการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ได้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างที่ผ่านการย้อม H&E ดังนั้นจึงวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบด้วย unmethylation primer เท่านั้น โดยเป็นดีเอ็นเอตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จำนวน 13 ตัวอย่าง มี 8 ตัวอย่างที่มีการตรวจพบปริมาณการเรืองแสงของ SYBR[®] Green และดีเอ็นเอตัวอย่างของบุคคลที่มีรังไข่ปกติจำนวน 15 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ผลพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่างผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน *STK38* ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวจะให้ผลลัพธ์ที่มีความแม่นยำมากขึ้นเมื่อนำไปตรวจสอบร่วมกับการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ ปัจจุบันมีตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาโดยการนำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการย้อม H&E มาใช้ในการตรวจสอบบริเวณที่เป็นมะเร็ง หรือพื้นที่ที่เซลล์เกิดความผิดปกติ เพื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างบริเวณที่ผิดปกติ กับบริเวณที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด และจะแสดงผลออกมาในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลต่อไปในอนาคต (Grounds, 2014) รวมทั้งการที่ต้องอาศัยการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์มีความจำเป็นต้องใช้สไลด์ที่ผ่านการย้อมสีด้วยวิธีการย้อม H&E ซึ่งมีต้นทุนค่อนข้างสูง และอาจใช้เวลานาน เนื่องจากจำเป็นต้องผ่าตัดเพื่อนำเนื้อเยื่อรังไข่มาทำเป็นสไลด์

แล้วนำไปย้อม H&E เพื่อตรวจสอบ ต่างจากการตรวจสอบด้วยวิธี COBRA ที่ทราบผลได้ทันที และไม่จำเป็นต้องตรวจสอบร่วมกับสไลด์ที่ย้อม H&E (ฟาติมา ตีบทา, 2560)

การวิเคราะห์ผลเพื่อนำยีน *STK38* มาเป็นหนึ่งในตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) ถือว่ายังไม่เหมาะสม เนื่องจากผลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี MSP เพียงอย่างเดียวนั้นพบว่าระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ยีน *STK38* ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ ($p=0.1932$) ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ผลการทดลองร่วมกันระหว่างการตรวจสอบด้วยวิธี MSP และการตรวจสอบด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาจะพบว่าระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ยีน *STK38* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ ($p=0.0001$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคมะเร็งรังไข่ เช่น ยีน Human epididymal secretory protein E4 (*HE4*) (Moore et al., 2019) เป็นต้น ถึงแม้ว่าค่าที่ได้จากการคำนวณทางสถิติจะถือว่ามีความเหมาะสมต่อการนำยีน *STK38* มาเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคมะเร็งรังไข่ แต่ว่าจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่งานวิจัยนิยมใช้ในการตรวจสอบนั้นถือว่าน้อยมาก (Moore et al., 2019) ดังนั้นในการทดลองครั้งหน้าควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *STK38* ว่ามีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมะเร็งรังไข่หรือไม่ รวมทั้งในการคัดเลือกชิ้นเนื้อรังไข่ของกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่ควรมีการตรวจสอบแล้วสกัดดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่เป็นชิ้นส่วนมะเร็งเท่านั้นเพื่อลดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผล เนื่องจากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อปกติ

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่าง และ unmethylation primer พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างระหว่างผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.5ก)

จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างร่วมกับการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างระหว่างผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และบุคคลที่มีรังไข่ปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.5ข) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน *STK38* โดยวิธี MSP ด้วย unmethylation primer จะมีความแม่นยำมากขึ้นเมื่อมีการตรวจสอบร่วมกับการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์

เอกสารอ้างอิง

- โชติกา หยกทองวัฒนา. 2554. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. *Genomic and Genetics* 4 : 71-84.
- พิสมัย เจริญปัญญาวิทย์, ปิยะวัฒน์ เลาวหุตานนท์, ปฐมพร ศิริประภาศิริ, อาคม ชัยวีระวัฒน์ และ วีรุฒิ อิมสำราญ. 2559. *แนวทางการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งรังไข่*. กรุงเทพมหานคร : บริษัท โสสิต การพิมพ์ จำกัด.
- ฟาติมา ตีบทา. 2560. *เครื่องหมายเมทิลเลชันสำหรับมะเร็งรังไข่*. โครงการงานวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต, สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รักชาติ บุญงาชาติ. 2550. สถานการณ์ปัจจุบันของมะเร็งรังไข่. *สงขลานครินทร์เวชสาร* 25 : 537-547.
- Angsuwatcharakon, P., et al. 2016. Identification of pancreatic cancer in biliary obstruction patients by FRY site-specific methylation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17 : 4487-4490.
- Assanasan, T., Wannakrairot, P., Keelawat, S., Pramprayoon, N. and Chaipipat, M. 2004. Extranodal malignant lymphoma of the upper aerodigestive tract in King Chulalongkorn Memorial Hospital according to WHO classification. *Journal of the Medical Association of Thailand* 87 : S249-S254
- Baldwin, R.L., et al. 2000. BRCA1 Promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Research* 60 : 5329-5333.
- Braun, S.R. 2015. *Understanding ovarian cancer*. Illinois : Society of Gynecologic Oncology.
- Butler, J.M. 2012. DNA extraction methods. In *Advanced topics in forensic DNA typing : methodology*, pp.29-47. New York : Academic Press.
- Chan, J.K.C. 2014. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology* 22 : 12-32.

- Corrigan, A. 2017. *Ovarian cancer*. Washington : National Comprehensive Cancer Network.
- Davidović, R.S., Božović, A.M., Mandušić, V.L., and Krajnović, M.M. 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. *Central European Journal of Biology* 9 : 1127- 1139.
- Desjardins, P., and Conklin, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments* 45 : 1-4.
- Earp, M.A., and Cunningham, J.M. 2015. DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes. *Health & Human Services Public Access* 106 : 311-321.
- Fukumoto, T., et al. 2018. Repurposing Pan-HDAC inhibitors for ARID1A-mutated ovarian cancer. *Cell Reports* 22 : 3393-3400.
- George, D., and Mallery, P. 2016. *IBM SPSS statistics 23 step by step*. 14th, New York : Routledge.
- Goni, R., Garcia, P., and Foissac, S. 2009. The qPCR data statistical analysis. *Integromic White Paper* 9 : 1-9.
- Grounds, M. 2014. Quantification of histopathology in haemotoxylin and eosin stained muscle sections. *TREAT-Neuromuscle Network* 7 : 1-13.
- Joffre, C., et al. 2015. The pro-apoptotic *STK38* kinase is a new Beclin1 partner positively regulating autophagy. *Current Biology* 25 : 2479-2492.
- Koukoura, O., Spandidos, D.A., Daponte, A., and Sifakis, S. 2014. DNA methylation profiles in ovarian cancer: Implication in diagnosis and therapy (Review). *Molecular Medicine Reports* 10 : 3-9.
- Ku, J.L., Jeon, Y.K., and Park, J.G. 2009. Methylation-specific PCR. In J.M. Walker (ed.), *Methods in molecular biology*, pp.23-25. New York : Springer.
- Li, L.C., and Dahiya, R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18 : 1427-1431.

- Loftis, A.D., and Reeves, W.K. 2012. Principles of real-time PCR. In C. Wang (ed.), *Veterinary PCR diagnostics*. pp.3-17. Alabama : Bentham.
- Moore, R.G., et al. 2019. Multiple biomarker algorithms to predict epithelial ovarian cancer in women with a pelvic mass: can additional makers improve performance?. *Gynecologic Oncology* 153 : 320-325.
- Ozdemir, F., Altinisik, J., Karateke, A., Coksuer, H., and Buyru, N. 2012. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 4 : 1092-1096.
- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W., and Clark, S. 2011. DNA methylation: bisulfite modification and analysis. *Journal of Visualized Experiments* 56 : 3170-3178.
- Plass, C. 2011. Methylation. In M. Schwab (ed.), *Encyclopedia of cancer*. 3rd edition, pp.2277-2278. Berlin : Springer.
- Ponchel, F., et al. 2003. real-time PCR based on SYBR-green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BioMed Central Biotechnology* 3 : 1-13.
- Salehi, F., Dunfield, L., Phillips, K.P., Krewski, D., and Vanderhyden, B.C., 2008. Risk factors for ovarian cancer: An overview with emphasis on hormonal factors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 11 : 301-321.
- Widschwendter, M., et al. 2009. *HOXA* methylation in normal endometrium from premenopausal women is associated with the presence of ovarian cancer: A proof of principle study. *International Journal of Cancer* 125 : 2214-2218.
- Xiong, Z., and Laird, P.W. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research* 25 : 2532-2534.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย unmethylation *STK38* primer

primer	samples	C_t average
Unmethylation <i>STK38</i> primer	Unmet 100%	22.46
	OVISE	27.24
	OC3	27.01
	OC7	29.3
	OC8	35.85
	OC9	29.85
	OC12	34.68
	OC13	35.96
	OC14	35.66
	OC20	24.23
	OC21	36.63
	OC22	34.10
	OC25	35.76
	OC71	35.27
	OC72	39.24
	OC73	38.13
	OC75	31.96
	OC76	26.41
	OC77	39.94
	OC83	26.39
	OC85	32.78
	OC87	33.22
	OC88	34.24
	OC89	undetermined
	OC90	28.97
	OC91	undetermined
OC92	undetermined	
OC93	32.14	

ตารางที่ 1 (ต่อ) ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย unmethylation *STK38* primer

primer	samples	C_t average
Unmethylation <i>STK38</i> primer	NO16	29.37
	NO18	28.34
	NO28	29.24
	NO29	29.98
	NO41	undetermined
	NO42	33.88
	NO43	undetermined
	NO44	undetermined
	NO45	35.81
	NO46	undetermined
	NO47	undetermined
	NO49	33.61
	NO51	31.16
	NO55	29.95
	NO56	33.00
	NO57	35.31
	NO58	34.77
	NO59	34.02
	NO60	34.26
	NO61	31.76
negative control	ไม่พบการปนเปื้อนของ master mix	

ตารางที่ 2 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย methylation *STK38* primer

primer	samples	C_t average
Methylation <i>STK38</i> primer	Met 100%	21.78
	OVISE	33.12
	OC3	30.64
	OC7	35.54
	OC14	32.94
	OC83	33.61
	OC85	31.87
	OC87	undetermined
	OC88	undetermined
	OC89	undetermined
	OC90	31.52
	OC91	undetermined
	OC92	undetermined
	NO41	30.81
	NO42	undetermined
	NO43	33.59
	NO51	undetermined
	NO55	31.60
	NO56	28.34
	NO57	undetermined
	NO58	undetermined
	NO59	undetermined
	NO60	undetermined
	negative control	ไม่พบการปนเปื้อนของ master mix

ตารางที่ 3 ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย methylation beta-actin primer

primer	samples	C_t average
methylation beta-actin primer	Unmet 100%	23.45
	OVISE	27.66
	OC3	27.18
	OC7	29.84
	OC8	29.93
	OC9	26.71
	OC12	35.95
	OC13	31.03
	OC14	34.76
	OC20	35.09
	OC21	38.97
	OC22	36.40
	OC25	35.67
	OC71	34.38
	OC72	36.76
	OC73	38.60
	OC75	31.98
	OC76	25.77
	OC77	35.34
	OC83	23.58
	OC85	34.90
	OC87	33.59
	OC88	33.99
	OC89	37.91
	OC90	37.10
OC91	38.88	
OC92	34.79	
OC93	38.13	

ตารางที่ 3 (ต่อ) ค่า C_t เฉลี่ยของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ถูกตรวจสอบด้วย methylation beta-actin primer

primer	samples	C_t average
methylation beta-actin primer	NO16	27.12
	NO18	25.93
	NO28	27.01
	NO29	26.98
	NO41	35.95
	NO42	34.65
	NO43	30.65
	NO44	34.68
	NO45	33.51
	NO46	29.90
	NO47	33.39
	NO49	33.17
	NO51	29.74
	NO55	30.64
	NO56	33.67
	NO57	35.32
	NO58	36.21
	NO59	34.91
	NO60	32.31
	NO61	30.23
negative control	ไม่พบการปนเปื้อนของ master mix	

ตารางที่ 4 ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer และความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ

samples	ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)
OC3	-0.17	12.05
OC7	-0.54	12.19
OC8	5.92	9.76
OC9	3.14	10.81
OC12	-1.27	12.47
OC13	4.93	10.13
OC14	0.90	11.65
OC20	-0.85	16.08
OC21	-2.34	12.87
OC22	-2.30	12.86
OC25	0.09	11.96
OC71	0.89	11.65
OC72	2.48	11.06
OC73	-0.47	12.17
OC75	-0.02	12.00
OC76	0.64	11.75
OC77	4.60	10.26
OC83	2.81	10.93
OC85	-2.12	12.79
OC87	-0.37	12.13
OC88	0.25	11.90
OC89	undetermined	undetermined
OC90	-8.13	15.05
OC91	undetermined	undetermined
OC92	undetermined	undetermined
OC93	-5.99	14.25

ตารางที่ 4 (ต่อ) ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ

samples	ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)
NO16	2.25	11.14
NO18	2.41	11.08
NO28	2.23	11.15
NO29	3.00	10.86
NO41	undetermined	undetermined
NO42	-0.77	12.28
NO43	undetermined	undetermined
NO44	undetermined	undetermined
NO45	2.30	11.12
NO46	undetermined	undetermined
NO47	undetermined	undetermined
NO49	0.44	11.82
NO51	1.42	11.46
NO55	-0.69	12.25
NO56	-0.67	12.24
NO57	-0.01	11.99
NO58	-1.44	12.53
NO59	-0.89	12.33
NO60	1.95	11.26
NO61	1.53	11.41

ตารางที่ 5 ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer ของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ และอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ของโรคด้วยวิธีการย้อม H&E

samples	ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	อัตราส่วน	ผลคูณระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับอัตราส่วน
OC12	-1.27	12.47	0.6	7.48
OC13	4.93	10.13	0.5	5.07
OC14	undetermined	undetermined	0.45	undetermined
OC20	-0.85	12.31	0.15	1.85
OC21	undetermined	undetermined	0.8	undetermined
OC22	-2.30	12.86	0.2	2.57
OC25	0.09	11.96	0.35	4.19
OC71	0.89	11.65	0.45	5.24
OC72	undetermined	undetermined	0.7	undetermined
OC73	undetermined	undetermined	0.9	undetermined
OC75	-0.02	12.00	0.85	10.20
OC76	0.64	11.75	0.85	9.99
OC77	undetermined	undetermined	0.15	undetermined
NO16	2.26	11.14	0.01	0.11
NO18	2.41	11.08	0.01	0.11
NO28	2.23	11.15	0.01	0.11
NO29	3.00	10.86	0.01	0.11
NO42	-0.77	12.28	0.01	0.12
NO45	2.30	11.12	0.01	0.11
NO49	0.44	11.83	0.01	0.12
NO51	1.42	11.46	0.01	0.11
NO55	-0.69	12.25	0.01	0.12
NO56	-0.68	12.24	0.01	0.12
NO57	-0.02	12.00	0.01	0.12

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer ของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณ และอัตราส่วนที่ได้จากการประเมินสัดส่วนของมะเร็งในชิ้นเนื้อทั้งหมดในสไลด์ของโรคด้วยวิธีการย้อม H&E

samples	ผลต่างระหว่างค่า C_t เฉลี่ยของ unmethylation primer กับ methylation beta-actin primer	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	อัตราส่วน	ผลคูณระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับอัตราส่วน
NO58	-1.44	12.53	0.01	0.12
NO59	-0.89	12.33	0.01	0.12
NO60	1.95	11.25	0.01	0.11
NO61	1.53	11.41	0.01	0.11