

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

“การดื้อยาไมยโตมัยซินซีในผู้ป่วย (ไทย)
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (ณ วชิรพยาบาล)”

“The resistance to mytomyacin C in
Thai patients with urinary bladder cancer
(at Vajira Hospital)”

18 S.A. 2544

งบประมาณประจำปี 2543
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.นพ. อธิคม สุภาพผล
ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุภาพผล
อาจารย์ พรรณี หนูชื้อตรง
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	2
สารบัญภาพ	4
สารบัญตาราง	6
กิตติกรรมประกาศ	7
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	8
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	9
บทนำ	10
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	10
- วัตถุประสงค์	11
- ขอบเขตการวิจัย	11
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ	11
การทบทวนวรรณกรรม	12
- ชนิดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	12
- มัยโตมัยชินชี	15
- สารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	16
- สารอนุมูลอิสระและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	17
- สารต้านอนุมูลอิสระและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	19
- การด้อยามของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	21
- แนวคิดในการทำโครงการวิจัย	22
ระเบียบวิธีวิจัย	25
- ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	25
- สถานที่ทำการวิจัย	25
- ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	25
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	25
- วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	25
- สารเคมี	26
- วิธีดำเนินการวิจัย	28

ผลการวิจัยและอภิปรายผล	32
- การเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่ดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV	32
- การศึกษาการแตกหักของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte จากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV	35
- การวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระในพลาสมา	42
- การวิเคราะห์ superoxide dismutase ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	43
- การวิเคราะห์ glutathione peroxidase ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	45
- การวิเคราะห์ catalase ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	47
- การวิเคราะห์ glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	48
- การวิเคราะห์ alanine transaminase ในพลาสมา	49
- การวิเคราะห์ aspartate transaminase ในพลาสมา	50
- การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมา	50
- การศึกษาความเป็นกรดด่างของปัสสาวะผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	51
บทสรุป	60
- สรุปผลการวิจัย	60
- ข้อเสนอแนะ	63
- ปัญหาในการทำวิจัย	64
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก	81
- การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน	81
- การวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde	81
- การวิเคราะห์ปริมาณ superoxide dismutase	82
- การวิเคราะห์ปริมาณ glutathione peroxidase	84
- การวิเคราะห์ปริมาณ catalase	84
- การวิเคราะห์ปริมาณ glutathione	85
- การวิเคราะห์ปริมาณ alanine transaminase	86
- การวิเคราะห์ปริมาณ aspartate transaminase	87
- การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน	87

สารบัญภาพ

ภาพ 1	แสดงลักษณะของก้อนเนื้อมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC และ IBC	13
ภาพ 2	แสดงระยะต่าง ๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	14
ภาพ 3	แสดงลักษณะเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะระยะเริ่มต้นเป็น squamous cell carcinoma ที่เหมาะต่อการนำมาแยกเลี้ยงเป็น primary cell culture	34
ภาพ 4	แสดงลักษณะของโครโมโซมปกติของมนุษย์ และการจัดแบ่งกลุ่ม A - G	36
ภาพ 5	แสดงการย้อมโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของอาสาสมัครปกติหญิงด้วยสี Giemsa's ใน 2 ลักษณะคือ G-banding และ non-banding	38-39
ภาพ 6	แสดงการย้อมโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชายด้วยสี Giemsa's ใน 2 ลักษณะคือ G-banding และ non-banding	40-41
ภาพ 7	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	52
ภาพ 8	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ superoxide dismutase (SOD) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	53

ภาพ 9	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ glutathione peroxidase (GPx) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	54
ภาพ 10	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ catalase ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	55
ภาพ 11	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ glutathione ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	56
ภาพ 12	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ alanine transaminase (ALT) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	57
ภาพ 13	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ aspartate transaminase (AST) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	58
ภาพ 14	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมา ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย	59
ภาพ 15	กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน	89
ภาพ 16	กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde	90
ภาพ 17	กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glutathione	91

สารบัญตาราง

ตาราง 1	แสดงการกำหนดระยะ (stage) ของก้อนเนื้องอก มะเร็งกระเพาะปัสสาวะตามระบบของ TNM	14
ตาราง 2	เปรียบเทียบปริมาณสารอนุมูลอิสระในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้	42
ตาราง 3	เปรียบเทียบปริมาณ superoxide dismutase (SOD) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้	44
ตาราง 4	เปรียบเทียบปริมาณ glutathione peroxidase (GPx) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้	46
ตาราง 5	เปรียบเทียบปริมาณ catalase (CAT) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้	47

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้โอกาสคณะผู้วิจัยเสนอโครงการวิจัยและได้รับการพิจารณาให้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2543 จำนวน 300,000 บาท (สามแสนบาทถ้วน)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ความวิริยะอุตสาหะอย่างเต็มที่เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ขอทุนไว้ และใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.นพ. อธิคม สุธาผล
ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุธาผล
อาจารย์ พรรณี หนูเชื้อตรง

บทคัดย่อ

ก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด superficial bladder cancer (SBC) ที่คือต่อ ยามัยโตมัยซินนั้นได้มาจากการผ่าตัดแบบ transurethral bladder resection การเพาะ เลี้ยงเพื่อแยกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่คือต่อ ยามัยโตมัยซินซึ่งควรคัดเลือกรักษาเนื้อมะเร็งที่อยู่ในระยะแรก ๆ โดยเฉพาะระยะ Ta และ TIS จะได้ผลดี ก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC ในระยะท้าย ๆ จะมี พัฒนาการไม่ดี และไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เป็น primary cell line ได้

ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่คือต่อยามัยโตมัยซินจะมีปริมาณสารอนุมูล- ออิสระในพลาสมาสูงเป็น 2 เท่าของอาสาสมัครปกติ สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดภายใน เซลล์เม็ดเลือดแดงคือ glutathione มีปริมาณลดลงประมาณ 24 % ขณะที่สารต้าน อนุมูลอิสระบางชนิดภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง เช่น superoxide dismutase และ catalase ลดปริมาณลงประมาณครึ่งหนึ่ง แต่ glutathione peroxidase มีปริมาณสูงกว่าปกติ ประมาณเท่าตัว สันนิษฐานว่าเซลล์มีความจำเป็นต้องกำจัดสารอนุมูลอิสระในกระแส เลือด โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่จำเพาะต่อสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกล่าวคือ สาร อนุมูลอิสระประเภท hydroperoxides น่าจะมีมากที่สุด ทั้งนี้พิจารณาจากการที่มี เอนไซม์ glutathione per-oxidase activity สูงมาก สำหรับสารอนุมูลอิสระประเภทอื่น คือ superoxide anion และ hydrogen peroxide อาจมีไม่มากดังเช่นสาร hydroperoxides

การศึกษาความเป็นกรดด่างของปัสสาวะครั้งแรกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะ ปัสสาวะหลังจากได้รับยามัยโตมัยซินชี้ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของยาควรจะคง เดิมเนื่องจากความเป็นกรดด่างของปัสสาวะไม่เปลี่ยนแปลงคือยังคงสภาพความเป็นกรด ที่เหมาะต่อการออกฤทธิ์ของยามัยโตมัยซิน ดังนั้นการคือต่อยามัยโตมัยซินน่าจะมี สาเหตุอื่นนอกเหนือจากการลดประสิทธิภาพของยาจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด ด่างของน้ำปัสสาวะ

ABSTRACT

Bladder tumors were obtained from patients with localized superficial bladder cancer undergoing transurethral bladder resection. The early stages, Ta and TIS, were necessary for cell culture to obtain primary cell line of urinary bladder cancer cells. The tumors with stages higher than that was mentioned, would be developed poorly and unable to grow as primary cell line.

For the bladder cancer patients resistant to mitomycin C, serum lipid peroxide metabolite, malondialdehyde, was increased twice than that of the normal individual. Some of the intracellular antioxidant tools in red blood cell, glutathione, was decreased approximately 24 %. Superoxide dismutase and catalase were decreased approximately half of the normal volunteers. The level of glutathione peroxidase activity was shown twice higher than that of the normal value. This might be due to the essence of cell to minimize free radical substances produced and circulated in the blood stream by utilizing the corresponding intracellular antioxidant contents. The high level of glutathione peroxidase activity implied that the concentration of the hydroperoxides was high. The other free radicals, superoxide anion and hydrogen peroxide, might not be as high as hydroperoxides.

After the intravesical instillation with mitomycin C, urinary pH was remained in acidic range which was suitable for mitomycin C activity. The cause of the drug resistance should not be the fluctuation of the urinary pH during the mitomycin C intravesical instillation.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ superficial bladder cancer (SBC) จะเป็นก้อนเนื้องอกยื่นออกมาจากเซลล์บุผิวของกระเพาะปัสสาวะ และ invasive bladder cancer (IBC) ซึ่งเป็นก้อนเนื้องอกที่ลุกลามเข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะ⁽¹⁻³⁾ โครงการวิจัยนี้เน้นที่มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC การรักษามาตรฐานที่ทำกันในปัจจุบันคือการส่องกล้องเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ แล้วใช้ไฟฟ้าจี้หรือตัดเนื้อร้ายออกทิ้งไป ต่อจากนั้นก็ใส่ยาเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะเพื่อให้ยาสัมผัสกับผิวกระเพาะปัสสาวะโดยตรง ยาที่มีข้อบ่งใช้และนิยมกันมากชนิดหนึ่งคือ มัยโตมายซินซี (mitomycin C, MMC) เพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งที่อาจหลงเหลืออยู่และป้องกันการกลับเป็นซ้ำใหม่⁽⁴⁻⁷⁾

หลังการผ่าตัดเอาเนื้อร้ายมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC ออกไปแล้ว หากไม่ใส่ยาใด ๆ เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะจะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสกลับเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้อีกถึง 40-80 %⁽⁸⁻⁹⁾ เมื่อใช้มัยโตมายซินซี (40 มิลลิกรัมในน้ำเกลือ 40 มิลลิลิตร) ใส่ในกระเพาะปัสสาวะจะทำให้ผู้ป่วยประมาณ 40 % หายขาด อีก 40 % อาจกลับเป็นใหม่ได้อีก และอีก 20 % ไม่ตอบสนองต่อมัยโตมายซินซีคือกลับเป็นใหม่ได้อีก การกลับเป็นใหม่อาจกลายเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะประเภท IBC ที่ลุกลามเข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อซึ่งยากต่อการรักษา และมักลงท้ายด้วยการตัดกระเพาะปัสสาวะทิ้งไป หรือโรคลุกลามแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นจนหมดทางรักษา⁽⁴⁻⁵⁾

ปัจจุบันมัยโตมายซินซียังมีการนำมาใช้กับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกันอยู่มาก เนื่องจากใช้ได้ผลดีกับก้อนเนื้อประเภท high-grade⁽⁶⁾ ประสิทธิภาพดี อาการข้างเคียงต่ำมาก⁽¹⁰⁻¹²⁾ และมีการดูดซึมได้น้อยมากเพียง 1 % เท่านั้น⁽⁷⁾ รวมทั้งยังได้ผลดีกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ไม่ตอบสนองต่อยาอื่นบางชนิดเช่น thiotepa⁽⁴⁻⁵⁾ ดังนั้น หากสามารถค้นพบเครื่องหมายหรือ marker บางอย่างที่สามารถบ่งบอกถึงอัตราเสี่ยงในการกลับเป็นใหม่ของโรคนี้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อมัยโตมายซินซี (ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกย่อ ๆ ว่า “ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ”) ได้เป็นอย่างมาก

วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อหา marker ที่สามารถบ่งบอกถึงการที่มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV
- (2) ศึกษาปริมาณสาร lipid peroxides ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
- (3) ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อ และตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV ณ วชิรพยาบาล

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) ทราบ marker ที่สามารถบ่งบอกถึงการที่มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV
- (2) ทราบว่าสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีปริมาณสูงจริงหรือไม่
- (3) ร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้หรือไม่
- (4) เป็นพื้นฐานการวิจัยระดับสูงต่อไปเพื่อลดการกลับเป็นใหม่ของโรค โดยการพยายามลดปริมาณสาร lipid peroxides ในกระแสเลือด

การทบทวนวรรณกรรม

ชนิดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะเป็นมะเร็งที่พบบ่อยมากเป็นลำดับสองในบรรดา มะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะ ในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานผู้ป่วยใหม่เพิ่มขึ้น ราว 54,000 รายต่อปี⁽¹³⁾ สำหรับประเทศไทยไม่มีสถิติตัวเลขที่แน่นอนแต่ก็พบมาก เช่นเดียวกัน ส่วนใหญ่พบในผู้สูงอายุประมาณ 60-70 ปี ปัจจุบันสามารถพบในผู้ป่วยอายุน้อยได้เช่นกัน อัตราส่วนของผู้ป่วยชายต่อหญิงสูงถึง 4 : 1⁽¹⁴⁾ อาการนำทางคลินิกที่สำคัญคือการปัสสาวะเป็นเลือดและไม่ปวด (painless gross hematuria) ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของมะเร็งชนิดนี้คือบุหรี่ สารบางชนิดในโรงงานอุตสาหกรรมก็เป็นสาเหตุของมะเร็งนี้ได้เช่น สารในกลุ่ม aromatic amines และสารอนุพันธ์ของ benzidine เป็นต้น⁽¹⁵⁾

ก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่ประมาณ 90 % มีพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อเป็นชนิด transitional cell carcinoma (TCC) อีก 10 % เป็นชนิด squamous cell carcinoma และ adenocarcinoma⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ grade ของก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งออกได้เป็น 3 grade⁽¹⁸⁻²¹⁾ คือ

- low-grade tumor หรือ G1 tumor เซลล์มะเร็งมีลักษณะ well differentiation และจำกัดอยู่ในชั้น mucosa หากทำการรักษาในระยะนี้จะมีโอกาสหายขาดสูงมาก ผู้ป่วยน้อยกว่า 2 % ที่มะเร็งมีโอกาสลุกลามและแพร่กระจาย

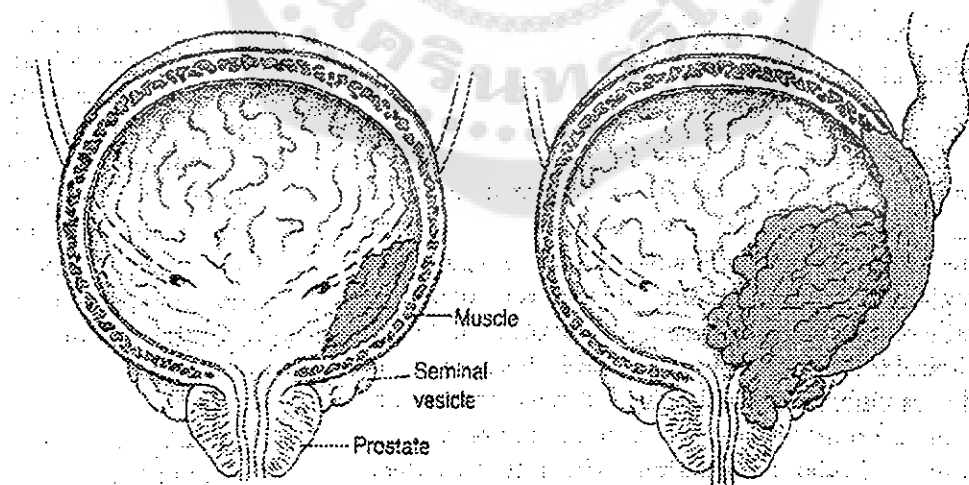
- intermediate-grade หรือ G2 tumor เซลล์มะเร็งมีลักษณะ moderately differentiation และแทรกตัวลงไปถึงชั้น lamina propria

- high-grade tumor หรือ G3 tumor เซลล์มีพัฒนาการไม่ดี ลักษณะเป็นแบบ poorly differentiation ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตเมื่อมีการแพร่กระจายลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในระยะ T2 - T4 จะมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นภายใน 2 ปี และมักเสียชีวิตภายใน 5 ปี ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยได้ในระยะเริ่มแรกจะก่อประโยชน์อย่างสูงในการรักษา

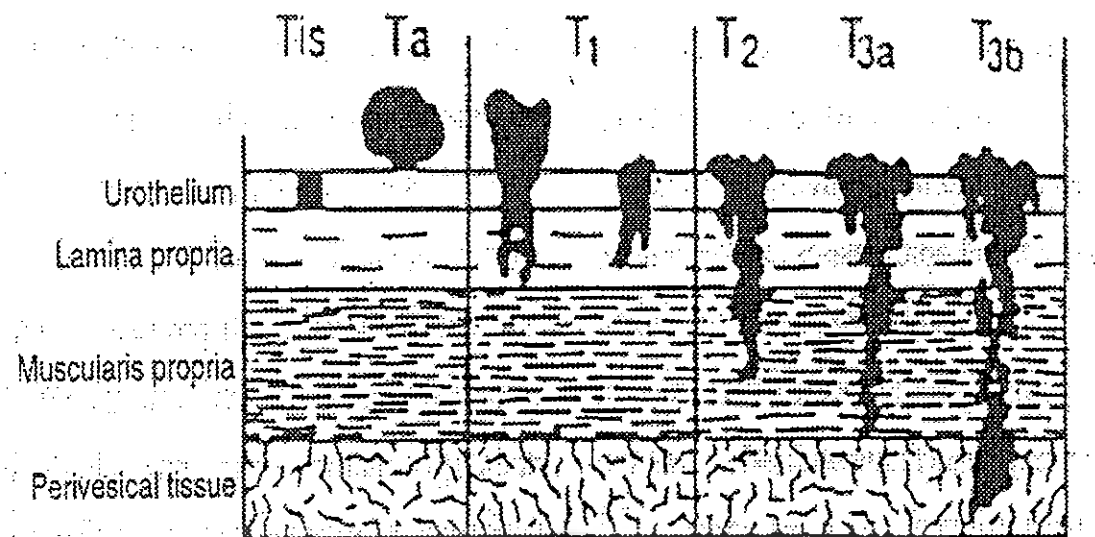
มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ⁽¹⁻³⁾ คือ superficial bladder cancer และ invasive bladder cancer

(1) *Superficial bladder cancer (SBC)* จะอยู่บริเวณผิว ๆ ของเยื่อบุผิวกระเพาะปัสสาวะ ไม่ลุกลามลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ลักษณะเป็นแบบ papillary มีหลอดเลือดมาเลี้ยงมากมาย และเซลล์มีพัฒนาการดี พบประมาณร้อยละ 75 สามารถรักษาได้ด้วยการผ่าตัดด้วยวิธีส่องกล้องผ่านท่อปัสสาวะเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (transurethral resection) ใส่ยาเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (intravesical chemotherapy หรือ intravesical immunotherapy) แล้วติดตามผู้ป่วยด้วยการส่องกล้องเข้าไปตรวจดูภายในกระเพาะปัสสาวะเป็นระยะ ๆ เพื่อดูการกลับเป็นใหม่ เซลล์มะเร็งในระยะ T1 จะแทรกตัวเข้าไปถึงชั้น lamina propria หรือ submucosa ส่วนระยะ Ta และ Tis เซลล์มะเร็งจะอยู่บริเวณเยื่อบุผิวกระเพาะปัสสาวะ ไม่ลามลงไปถึงชั้นระยะ T1

(2) *Invasive bladder cancer (IBC)* จะลุกลามทะลุผ่านชั้น lamina propria เข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อ detrusor พบประมาณร้อยละ 20 มักมีลักษณะเป็นแบบ solid และพัฒนาการของเซลล์ไม่ดีเท่าใดนัก (poorly differentiation) มีหลายระยะได้แก่ T2, T3a, T3b, T4a และ T4b โดยแบ่งตามความรุนแรงในการลุกลามของเนื้อเยื่อมะเร็งเข้าไปในเนื้อเยื่อใกล้เคียง (ตารางที่ 1) มะเร็งชนิดนี้มีอัตราเสี่ยงต่อการแพร่กระจายสูงกว่า SBC มาก การรักษาใช้การผ่าตัดกระเพาะปัสสาวะทิ้ง ร่วมกับการใช้ยาต้านมะเร็งหรือการฉายแสง เป็นต้น



ภาพ 1 แสดงลักษณะของก้อนเนื้อมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC และ IBC⁽³⁾



ภาพ 2 แสดงระยะต่าง ๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽²²⁾

ตาราง 1 แสดงการกำหนดระยะ (stage) ของก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะตามระบบของ tumor, node and metastasis (TNM)⁽²³⁾

ชนิดของก้อนเนื้อออก	TNM system
Superficial bladder cancer (SBC)	
carcinoma in situ (CIS)	TIS
noninvasive papillary	Ta
invasive into lamina propria	T1
Invasive bladder cancer (IBC)	
superficial muscle	T2
deep muscle	T3a
perivesical fibroadipose tissue	T3b
prostate, uterus, cervix, or vagina	T4a
pelvic or abdominal wall	T4b

มัยโตมายซินซี (mitomycin C, MMC)

มัยโตมายซินเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม quinone ในระยะหลัง ๆ มีผู้นำมาใช้เป็นยาต้านการเจริญของเนื้องอกโดยเฉพาะมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ สกัดได้จากเชื้อ *Streptococcus caespitosus* ในปี ค.ศ. 1958 มี aziridine group และ quinone group อยู่ในโมเลกุลตำราบางเล่มจัดมัยโตมายซินซีไว้ในกลุ่ม alkylating agent เพราะสามารถเกิดปฏิกิริยา alkylation กับสาย DNA ได้ cross-link ที่ตำแหน่ง N⁶ ของ adenine และที่ตำแหน่ง O⁶ กับ N⁷ ของ guanine อันเป็นกลไกสำคัญที่มีผลยับยั้งการสร้าง DNA และยังทำให้ DNA สายคู่แยกออกจากกันอีกด้วย จนนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด ปกติมัยโตมายซินซีจะดูดซึมในระบบทางเดินอาหารไม่แน่นอน จึงมักให้โดยการฉีดเข้ากระแสเลือดอย่างช้า ๆ ยานี้จะขับออกทางปัสสาวะในรูป active form น้อยมาก คือน้อยกว่า 10 % ดังนั้นการนำมารักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด superficial bladder cancer จะต้องให้ขนาด (dose) สูงมากทางกระแสเลือด ก่อให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงอย่างรุนแรงในการกดไขกระดูกเป็นพิษต่อตับ ไต และระบบไหลเวียน จึงต้องเล็งมาให้โดยใส่เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะโดยตรงที่เรียกว่า intravesical chemotherapy หรือ intracavitary chemotherapy ซึ่งมีรายงานว่าปลอดภัยแม้จะมีการดูดซึมบ้างแต่ก็ไม่มีโทษต่อร่างกาย ดังเช่นที่ให้โดยการฉีดเข้ากระแสเลือดหรือรับประทาน^(7, 24-33)

หลังการผ่าตัดทำ TUR เอนเนอรัยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC ออกไปแล้ว หากไม่ใส่ยาใด ๆ เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะจะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสกลับเป็นมะเร็งกระเพาะได้อีกถึง 40-80 %⁽⁸⁻⁹⁾ การรักษาขั้นต่อไปซึ่งสามารถป้องกันการกลับเป็นใหม่ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะก็คือ การใช้เคมีบำบัดในลักษณะ intravesical chemotherapy ซึ่งหมายถึงการใส่ยาเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะโดยตรงให้ยาได้มีโอกาสสัมผัสกับเยื่อผิวกระเพาะปัสสาวะ เพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่อาจหลงเหลืออยู่ รวมทั้งหยุดยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่อาจเกิดขึ้นใหม่ได้ การใช้มัยโตมายซินซี (ในขนาด 40 มิลลิกรัมในน้ำเกลือ 40 มิลลิลิตร) ใส่ในกระเพาะปัสสาวะจะทำให้ผู้ป่วยประมาณ 40 % หายขาด อีก 40 % อาจกลับเป็นใหม่ได้อีก และอีก 20 % ไม่ตอบสนองต่อยามัยโตมายซินซีคือกลับเป็นใหม่ได้อีก รายงานอีกจำนวนมากก็กล่าวถึงประสิทธิภาพในการใช้มัยโตมายซินซีหลังการผ่าตัดว่าให้ผลดีเหนือกว่าการทำผ่าตัด TUR เพียงอย่างเดียว⁽³⁴⁻⁴⁷⁾

ปัจจุบันยามัยโตมายซินซียังมีการนำมาใช้กับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกันอยู่มากเนื่องจากใช้ได้ผลดีกับก้อนเนื้อประเภท high-grade⁽⁶⁾ ประสิทธิภาพดี อาการข้างเคียง

ต่ำมาก⁽¹⁰⁻¹²⁾ และมีการดูดซึมได้น้อยมากเพียง 1 % เท่านั้น⁽⁷⁾ รวมทั้งยังได้ผลดีกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ไม่ตอบสนองต่อยาอื่นบางชนิดเช่น thiotepa⁽⁴⁻⁵⁾ แต่ก็พบว่าอาจมีการดื้อยาคือมีการกลับเป็นใหม่ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้อีก⁽⁴⁸⁾ ดังนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาปัจจัยที่ทำให้เกิดการดื้อยามัยโตมัซินซีจึงเป็นหนทางที่ดีที่สุดขณะนี้เมื่อเทียบกับการคิดค้นยาใหม่ ซึ่งจะต้องใช้เวลานานและลงทุนสูงกว่ามาก หากสามารถค้นพบครรชนหรือ marker บางอย่างที่สามารถบ่งบอกถึงอัตราเสี่ยงในการกลับเป็นใหม่ของโรคนี้นี้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัซินซีได้เป็นอย่างมาก

สารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron เกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว (anion radical, $R^{\cdot-}$) หรือได้รับอิเล็กตรอนเพิ่มมา 1 ตัว (cation radical, $R^{\cdot+}$) หรืออาจมีประจุเป็นกลาง (neutal radical, $R^{\cdot}$) นิยมเขียนสัญลักษณ์เป็นจุดดำไว้ข้างบน สารอนุมูลอิสระมีหลายกลุ่ม กลุ่มใหญ่ที่มีอยู่มากและได้รับความสนใจรวมทั้งมีอิทธิพลต่อมนุษย์คือสารอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ภายในโมเลกุลหรือที่เรียกกันว่า oxygen free radicals (OFRs) หรือ reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ hydrogen peroxide (H_2O_2), lipid peroxides (LOOH), hypochlorous acid (HOCl) เป็นต้น⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾

สารอนุมูลอิสระเกิดได้ง่ายจากพันธะ covalent ถูกทำลาย และอิเล็กตรอนของพันธะถูกแบ่งให้แก่ละอะตอมกลายเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวและพร้อมจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดพันธะที่ผิดปกติของ DNA มีการทำลายโปรตีน ไขมัน และ macromolecules อื่น ๆ เกิดความเสียหายมากมายต่อร่างกายตามมาได้แก่ การบาดเจ็บของเซลล์ การแก่ (aging) และโรคหลายชนิดได้แก่ atherosclerosis เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น⁽⁴⁹⁾ ปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระเป็นลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่คือ ทำให้สารที่ถูกอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาเสื่อมสภาพไป แล้วสร้างเป็นสารอนุมูลอิสระใหม่ไปทำปฏิกิริยาต่อไป เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือเนื้อเยื่ออื่นอีกต่อไปอย่างควบคุมไม่ได้ จนกว่าจะมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidants) มายับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าว⁽⁵⁰⁾

การวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระทำได้ลำบากมากเพราะอนุมูลอิสระไม่เสถียรและการที่สารอนุมูลอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยาที่สำคัญคือ ปฏิกิริยาต่อเยื่อหุ้มเซลล์หรือ

เยื่อหุ้ม organelle ภายในเซลล์ เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ให้สารในกลุ่ม lipid peroxides การเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องทำให้ทำให้วงการวิจัยทั่วไปใช้ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น metabolite ของ lipid peroxide และตรวจวัดได้ไม่ยากนัก เป็น marker บ่งบอกปริมาณของสารอนุมูลอิสระ⁽⁵¹⁾

ปกติร่างกายจะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระได้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของร่างกาย แต่เซลล์จะมีระบบหรือกระบวนการที่จะควบคุมและทำลายสารอนุมูลอิสระจากหลาย ๆ แห่ง ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione และอื่น ๆ ทำหน้าที่ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและกำจัดอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เราทุกคนไม่เกิดโรคจากสารอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น รวมทั้งกลไกของร่างกายเหล่านี้สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระจำนวนหนึ่งที่ได้รับจากภายนอก แต่หากร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจำนวนมากจนเกิดความเครียดหรือความกดดันจากสารอนุมูลอิสระ (oxidative stress) ระบบนี้ไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระได้ หรือมีกระบวนการบางอย่างที่ทำให้ระบบด้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระเสื่อมสภาพไปเอง ก็อาจทำให้เกิดโรคหลาย ๆ ชนิดดังกล่าวได้⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾

สารอนุมูลอิสระและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดและอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ รวมทั้งสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้รับความสนใจมานานและมีการศึกษากันไว้อย่างต่อเนื่อง⁽⁵²⁻⁵⁵⁾ รายงานการศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ระหว่างสารอนุมูลอิสระกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถสรุปได้เป็น 2 ประเด็นหลัก คือ

(1) สารอนุมูลอิสระก่อให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ในประเด็นนี้ถือว่าสารอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ทางด้านลบกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ เป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง สารอนุมูลอิสระหลายกลุ่มเช่น กลุ่ม reactive oxygen intermediates (ROI) ที่หลังจาก polymorphonuclear leukocyte ของมนุษย์ รวมทั้ง nitric oxide ซึ่งเป็น free radical gas ล้วนมีบทบาทสำคัญที่ก่อให้เกิดมะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะได้ทั้งสิ้น⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ Maeda รายงานไว้ว่าสารอนุมูลอิสระหลายชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อในร่างกาย ก่อให้เกิดเสียหายคือมีการแตกหักของสาร DNA และ RNA จนก่อให้เกิดมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾ หรืออาจ

มีผลบางอย่างในการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis⁽⁶¹⁾ หรือเกี่ยวข้องโดยทางใดทางหนึ่งในการเร่งให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁶²⁻⁶³⁾

(2) การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเร่งให้เกิดสารอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้อาจมีผล 2 ทางคือ

2.1 สารอนุมูลอิสระทำให้ภาวะของการเกิดมะเร็งยิ่งเลวร้ายลงอีก มีการทำลายและกลายพันธุ์ของเซลล์ต่าง ๆ มากขึ้น Gauchez และคณะรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1995 ว่า การปลูกเนื้ออกมะเร็งกระเพาะปัสสาวะลงในหนูทดลองก่อให้เกิด oxidative stress โดยเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือด และรบกวนระบบด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของร่างกายคือทำให้ระดับของ selenium และ glutathione peroxidase activity ลดลง⁽⁵⁵⁾

2.2 สารอนุมูลอิสระอาจไปกระตุ้นกลไกของการป้องกันตัวเอง (เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน) ให้เกิดกระบวนการบางอย่างมาทำลายเซลล์มะเร็ง สารอนุมูลอิสระบางชนิด เช่น hydroxyl radical และ hydrogen peroxide สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้⁽⁶⁴⁾ ในปี ค.ศ. 2001 คือ hydrogen peroxide ซึ่งเป็นแหล่งหนึ่งของ oxygen free radicals มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการแบ่งหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ (antiproliferative effect) ของยาต้านมะเร็งที่ชื่อ doxorubicin ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะของหนูทดลอง จุดนี้เองเริ่มต้นให้มีผู้ค้นคิดนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะในอนาคตได้และอาจเป็นผลดีต่อผู้ป่วยเนื่องจาก hydrogen peroxide มีราคาถูก ไม่เป็นอันตราย และฤทธิ์ข้างเคียงต่ำ⁽⁶⁵⁾

ก่อนหน้านี้ Mitropoulos และคณะได้เคยรายงานไว้ในปี ค.ศ.2000 ว่า การรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะอีกวิธีหนึ่งด้วยการใส่วัคซีน Bacillus Calmette-Guerin (BCG) เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (แทนมัยโตมายซินซี) หลังการผ่าตัด ทำให้เกิด oxygen free radical ในกระแสเลือดได้สูงถึง 5 เท่าของปกติ และสันนิษฐานว่า oxygen free radical อาจเป็นกลไกสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้กำจัดเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁶⁶⁾ ทั้งนี้การเพิ่ม oxidation stress หลังการรักษาด้วย BCG นี้เคยมีรายงานมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1987 แล้ว⁽⁶⁷⁾

สารต้านอนุมูลอิสระและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารที่ป้องกันหรือยับยั้งการเสื่อมสลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระ มีหลายกลุ่ม ในที่นี้จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในร่างกาย (endogenous antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกที่รับเข้าสู่ร่างกาย (exogenous antioxidants) รายงานจากหลาย ๆ แห่งกล่าวว่า สารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดลดอัตราการเกิดหรือขนาดของก้อนมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ ก็ยังทำให้หลาย ๆ ฝ่ายมั่นใจว่าสารอนุมูลอิสระเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งหรือเกี่ยวข้องทางใดทางหนึ่งกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

(1) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่แล้วภายในร่างกาย (endogenous antioxidants) เอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione และอื่น ๆ ปัจจุบันก็ยังมีความพยายามที่จะนำเอนไซม์ที่มีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาใช้เป็น marker ในการศึกษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁶⁸⁾

1.1 *superoxide dismutase (SOD)* การพยายามนำ SOD มาใช้เป็น marker ของมะเร็งหลายชนิดมีมาเป็นเวลานานแล้ว ในอดีตมีความพยายามนำ SOD มาใช้ลดผลข้างเคียงของการฉายรังสี⁽⁶⁹⁾ การทดลองให้ SOD หลังผ่าตัดกับผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถลดความเสียหายหรือผลข้างเคียงอันเกิดจากการฉายรังสี (หลังการผ่าตัด) ได้ดี⁽⁷⁰⁻⁷³⁾

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ SOD ในก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับเซลล์บุผิวกระเพาะปัสสาวะปกติพบว่า SOD activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สันนิษฐานว่าเนื่องจากเซลล์มะเร็งต้องเผชิญกับความเครียดจากสารอนุมูลอิสระจำนวนมาก⁽⁷⁴⁾

1.2 *Glutathione peroxidase (GPx)* ในอดีตมีการพยายามนำ glutathione-related enzyme มาศึกษาเพื่อใช้เป็น marker ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁷⁵⁾ Singh และคณะค้นพบว่า glutathione peroxidase ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงกว่าเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติประมาณ 1.5 เท่า จึงอาจใช้เอนไซม์นี้เป็น marker ของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ โดยเฉพาะในกรณีที่เนื้อเยื่อมะเร็งที่ดียิ่ง⁽⁷⁶⁾

แต่ Mohandus และคณะรายงานไว้ในลักษณะที่ขัดแย้งกันว่า เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะมี glutathione peroxidase activity ต่ำ และสันนิษฐานว่าเป็นสาเหตุของกระบวนการ carcinogenesis ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁷⁷⁾ และยังมี การค้นพบในฝูงปศุสัตว์ที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะอีกว่า glutathione และ glutathione peroxidase ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีระดับต่ำกว่าปกติ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของปศุสัตว์ที่เป็นมะเร็งชนิดนี้ไวต่อสารอนุมูลอิสระมากขึ้น⁽⁷⁸⁾

1.3 *Glutathione* Singh และคณะกล่าวไว้ว่าสาร glutathione ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีปริมาณไม่ต่างจากเนื้อเยื่อเซลล์กระเพาะปัสสาวะปกติ⁽⁷⁶⁾ แต่ Mohandus และคณะรายงานว่า glutathione ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับต่ำ และน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องในของกระบวนการ carcinogenesis ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁷⁷⁾

1.4 *Catalase* Singh และคณะรายงานไว้ในปี 1994 ว่า catalase activity ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะสูงกว่าเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติประมาณ 1-4 เท่า จึงอาจใช้เอนไซม์ catalase มาเป็น marker ของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ โดยเฉพาะในกรณีที่เป็นเนื้อมะเร็งที่ดื้อยา⁽⁷⁶⁾ ขณะที่ Durak รายงานไว้ในปีเดียวกันว่า catalase activity ในก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่ำกว่าในเซลล์บุผิวมะเร็งกระเพาะปัสสาวะปกติ⁽⁷⁴⁾

(2) สารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกที่รับเข้าสู่ร่างกาย (*endogenous antioxidants*) เป็นสารที่มักได้รับโดยการรับประทาน สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มนี้หลายชนิดให้ผลต้านการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ เช่น

2.1 *วิตามินเอ* มีผลปกป้อง (protective effect) ต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การบริโภควิตามินซีและผักสีเขียวบ่อย ๆ จะลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในระบบขับปัสสาวะส่วนล่าง (lower urinary tract)⁽⁷⁹⁾

2.2 *วิตามินซี* ก็มีผลปกป้อง (protective effect) ต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่นเดียวกับวิตามินเอ⁽⁷⁹⁾ และยังมีผลยับยั้งความผิดปกติของ DNA ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้⁽⁸⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารอนุพันธ์ของวิตามินซีบางตัวเช่น 2-O-octadecylascorbic acid มีผลลดกระบวนการ carcinogenesis ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในหนูทดลองอีกด้วย⁽⁸¹⁾

แต่การให้ sodium L-ascorbate ทำให้หนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็งมีขนาดของก้อนมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโตกว่าปกติ pH และระดับ L-ascorbic acid ในปัสสาวะเพิ่มขึ้นด้วย⁽⁸²⁾

2.3 วิตามินอี มีผลต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และลดขนาดของก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในหนูทดลองได้⁽⁸³⁻⁸⁴⁾

2.4 สารสกัดจากใบแป๊ะก๊วย (*Ginkgo biloba extract*) สามารถเร่งการตอบสนองในลักษณะที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันคือ เพิ่มปริมาณ SOD, glutathione และลดการแตกหักเสียหายของโครโมโซมเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้⁽⁸⁵⁾

2.5 กระเทียม (*Allium sativum*) การรับประทานกระเทียมและการฉีดสารจากกระเทียมมีผลลดขนาดของก้อนเนื้องอกในหนูทดลองได้⁽⁸⁶⁾

2.6 Selenium นอกจาก selenium จะมีผลป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแล้ว⁽⁸⁷⁾ และยังพบอีกว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ selenium ในกระแสเลือดลดลง รวมทั้งปริมาณของ selenium จะแปรตาม glutathione peroxidase activity ในกระแสเลือดอีกด้วย⁽⁸⁸⁾

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ มีผลยับยั้งความผิดปกติของ DNA ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้⁽⁸⁹⁾

ผลจากการพบว่าสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ทำให้มีผู้สนใจศึกษาความสัมพันธ์ของสารอนุมูลอิสระและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกันมากขึ้น

การดื้อยาของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อยาด้านมะเร็งบางชนิด เช่น cisplatin และ doxorubicin จะมีระดับ glutathione และ glutathione peroxidase สูงกว่าปกติ เมื่อทดลองให้สารบางชนิดเช่น L-buthionine sulfoximine ซึ่งทำหน้าที่ลดปริมาณสาร glutathione (glutathione depletion) ก็พบว่า เซลล์มะเร็งจะไวต่อ cisplatin มากขึ้น 1.3-1.7 เท่า และไวต่อ doxorubicin 1.45-11.2 เท่า⁽⁹⁰⁾ ในทางกลับกัน ลักษณะของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ไวต่อยาด้านมะเร็ง cisplatin จะมีปริมาณ glutathione ภายในเซลล์ต่ำ แต่ glutathione peroxidase activity จะสูงกว่าปกติ⁽⁹¹⁾

มะเร็งกระเพาะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินยังมีผู้ศึกษาในผู้ป่วยกันน้อยมาก ส่วนใหญ่จะศึกษาในก้อนเนื้ออกหรือเซลล์เพาะเลี้ยง (secondary cell line) กันมากกว่า Xu และคณะเชื่อว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินมีสาเหตุมาจากความสามารถของเซลล์ที่จะลดปริมาณสารอนุมูลอิสระได้ อย่างไรก็ตามสาเหตุของการดื้อยามัยโตมัชินซินน่าจะมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน (multifactor)⁽⁹²⁾

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินยังมีไม่มาก สาร glutathione และเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินไม่แตกต่างจากเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะธรรมดา⁽⁹¹⁾

สำหรับเอนไซม์ catalase ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินจะสูงกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะธรรมดาไม่มากนัก แต่ก็มีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁹²⁾

แนวคิดในการทำโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ต้องการหา marker ที่บ่งบอกการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซิน โดยคณะผู้วิจัยตั้งประเด็นไว้ว่าอาจพบ marker ได้จาก 3 แหล่งใหญ่ ๆ คือ ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซิน

(1) การศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ เป็นความพยายามนำชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซินมาเลี้ยงให้กลายเป็น primary cell line เพื่อศึกษาในระดับพันธุกรรมว่ามียีนใดผิดปกติไปบ้างหรือไม่เช่น MDR gene หรือ p53 gene เป็นต้น

(2) การศึกษาในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ การศึกษาหา marker ในตัวอย่างเลือดแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การศึกษาการแตกหักของโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte และการศึกษาาระบบ oxidation-antioxidation system ในพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัชินซิน

2.1 การแตกหักของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte ปกติความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยจะพบในเซลล์มะเร็งโดยตรง แต่คณะผู้วิจัยมีแนวคิดว่าจะหาทดลองศึกษาโครโมโซมของเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยและสามารถพบความผิดปกติในการแตกหักของโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ที่เกิดซ้ำ ๆ กัน ก็จะสามารถนำมาใช้เป็น marker บ่งบอกลักษณะพิเศษของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ได้ หรืออีกนัยหนึ่งคือสามารถบอกได้ว่ามะเร็งกระเพาะปัสสาวะของผู้ป่วยนั้นจะดื้อต่อยาต้านไวรัสหรือไม่ด้วยการเจาะเลือด ซึ่งจะสะดวกมาก

2.2 การศึกษาระบบ oxidation-antioxidation system ในพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า ในโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคหัวใจ ตับล้มเหลว ไตล้มเหลว มะเร็ง เบาหวาน atherosclerosis และโรคอื่น ๆ อีกหลายชนิดจะมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระในร่างกายสูงกว่าคนปกติ แต่สำหรับในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเฉพาะชนิดที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสยังไม่มีการศึกษารายงานระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในกระแสเลือดไว้เลยทั้งในและต่างประเทศ ดังนั้นหากทำการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในกระแสเลือดและพบความผิดปกติที่ชัดเจน ก็อาจจะนำมาพิจารณาเป็น marker ในเบื้องต้นได้นั้นคือสามารถบ่งบอกการดื้อยาต้านไวรัสด้วยการเจาะเลือดมาตรวจ

รายงานการวิจัยจากต่างประเทศมักศึกษาสารอนุมูลอิสระโดยการปลูกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะลงในสัตว์ทดลอง ผลที่ได้อาจมีความแตกต่างกันระหว่างสัตว์ทดลองและร่างกายมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาโดยตรงจากร่างกายมนุษย์น่าจะสรุปได้ตรงตามที่จะเป็นมากกว่า

สำหรับเอนไซม์ที่ต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์นั้น รายงานวิจัยที่ตีพิมพ์ส่วนใหญ่จะศึกษาโดยตรงจากก้อนเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักฐานได้ตัวอย่างหนึ่ง แต่การศึกษาในก้อนเนื้อมะเร็งฯ มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ (1) ต้องทำการผ่าตัดก่อน การผ่าตัดอาจเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายมะเร็ง และผู้ป่วยจะต้องเจ็บปวด (2) ก้อนเนื้อออกมีขนาดจำกัด เอนไซม์ที่ได้ก็มีปริมาณไม่มาก การวิเคราะห์ซ้ำ (repeat) เพื่อยืนยันผลทำได้ยากหรือทำไม่ได้เลย แต่หากเป็นการเจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์จะสามารถแก้ไขข้อจำกัดทั้งสองประการนี้ได้

(3) การศึกษาตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ เป็นการศึกษการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง (pH) ของยามีโตมัยซินซีในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ เนื่องจากยามีโตมัยซินซีจะออกฤทธิ์ได้ดีในตัวกลาง (media) ที่เป็นกรดประมาณ 5.8-6.0⁽⁹³⁻⁹⁶⁾ การวิจัยในส่วนนี้เพื่อพิสูจน์ว่าการดื้อยามีโตมัยซินซีของผู้ป่วยมีสาเหตุมาจากเซลล์มะเร็งจริง ๆ มิใช่เนื่องมาจากการที่ฤทธิ์ของยาลดลงในตัวกลางที่ไม่เป็นกรด



ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยผู้ป่วยในโครงการวิจัยนี้จะต้องไม่เป็นโรคอื่นที่ทำให้มีปริมาณสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดสูง คือ เบาหวาน มะเร็งชนิดอื่น เอชดี และตับอักเสบ

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23, กรุงเทพฯ 10110

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มีนาคม 2543 - มิถุนายน 2544

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
เครื่องนึ่งปราศจากเชื้อ (autoclave)
เครื่องประมวลผล (microcomputer)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
เครื่องปั่นผสม (vortex)
อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
กล่องแสงฟลูออเรสเซนซ์

วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

autopipette ขนาดต่าง ๆ
pipette tip ขนาดต่าง ๆ
pipette tip rack
eppendorf tube
eppendorf tube rack

glass test tube
 glass test tube with screw cap
 test tube rack
 quartz cuvette
 ขวดแก้ว (Duran) ขนาดต่าง ๆ
 autoclaved tape
 aluminium foil

สารเคมี

น้ำกลั่น ปราศจากเชื้อ (องค์การเภสัชกรรม)
 น้ำกลั่น (double - distilled water)
 ethanol (Merck)
 chloroform (Merck)
 ethyl acetate (Merck)
 sodium chloride (Merck)
 Drabkin's solution (Sigma)
 standard hemoglobin (Sigma)
 potassium cyanide (Merck)
 malonaldehyde (MDA) (Sigma)
 sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck)
 acetic acid (Merck)
 thiobarbituric acid (TBA) (Sigma)
 n butanol (Merck)
 pyridine (Merck)
 อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) (Gibco)
 อาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (Gibco)
 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)
 fetal calf serum (FCS) (Gibco)

trypsin (Gibco)
 sodium bicarbonate (Merck)
 penicillin G sodium (Gibco)
 streptomycin (Gibco)
 sodium hydroxide (Merck)
 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck)
 nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma)
 riboflavin (Sigma)
 potassium dihydrogen phosphate (Merck)
 dipotassium hydrogen phosphate (Merck)
 hydrochloric acid (Merck)
 reduced glutathione (Sigma)
 β - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β - NADPH) (Sigma)
 Tris buffer (Merck)
 glutathione reductase (Fluka)
 cumene hydroperoxide (Sigma)
 disodium hydrogen phosphate (Merck)
 dithionitrobenzoic acid (DTNB) (Sigma)
 hydrogen peroxide (Sigma)
 bovine serum albumin (Gibco)
 reagent solution สำหรับตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ ALT (Chiron)
 reagent solution สำหรับตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ AST (Chiron)
 collagenase (Sigma)
 heparin (Leo)
 epidermal growth factor (Sigma)
 Hanks's balanced salt solution (Gibco)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ประมาณ 2 มิลลิลิตร ในหลอดปราศจากเชื้อที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือดด้วย heparin ขนาด 50 unit ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดนี้จะนำเตรียมเป็น 2 ส่วนคือ

1.1 พลาสมา นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสชั้นบนซึ่งเป็นพลาสมาเก็บไว้ แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดซึ่งเป็นเม็ดเลือดแดง (packed red blood cells) ไปเตรียม hemolysate ต่อในข้อ 1.2

1.2 hemolysate นำเม็ดเลือดแดงในข้อ 1.1 มาเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (sterile normal saline solution) 10 มิลลิลิตร กลับหลอดทดลองเบา ๆ ให้เม็ดเลือดแดงกระจายตัวในน้ำเกลืออย่างสม่ำเสมอ ปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วน supernatant ทิ้งไป นำเม็ดเลือดแดงไปเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (sterile normal saline solution) 10 มิลลิลิตร กลับหลอดทดลองเบา ๆ ให้เม็ดเลือดแดงกระจายตัวในน้ำเกลืออย่างสม่ำเสมอ ปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วน supernatant ทิ้งไป ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อล้างเม็ดเลือดแดงให้สะอาด ครั้งสุดท้ายพยายามดูดส่วน supernatant ทิ้งไปให้หมด เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1.5 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดง ก็จะมีส่วน hemolysate มาเก็บไว้

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ในโครงการวิจัยนี้มี 2 ชนิด คือ RPMI 1640 และ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) แต่ละชนิดมีลักษณะเป็นอาหารผงแห้งกึ่งสำเร็จรูป จำหน่ายเป็นซอง แต่ละซองสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ 1 ลิตร การเตรียมเป็นไปในลักษณะเดียวกันคือเทผสมผงอาหารลงในน้ำกลั่นสำหรับเตรียมยาฉีด (sterile water for injection) ละลายให้เข้ากันดี เติมยาปฏิชีวนะ penicillin 50,000 unit และ streptomycin 100 มิลลิกรัม ปรับ pH เป็น 7.2 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

ต่อจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านชุดกรองปราศจากเชื้อที่มีกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ขนาด pore size 0.22 ไมครอน เฉพาะขั้นตอนการกรองนี้จะต้องทำใน laminar air flow hood เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากเชื้อ และทุกครั้งที่เราเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์จะต้องแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 3-5 มิลลิลิตรใส่ในขวดปราศจากเชื้อ (tissue cultured flask)

หรือ plate ปราศจากเชื้อ (tissue cultured petridish) ขนาดเล็ก แล้วนำไปอบในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 37 °ซ. นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หากไม่มีการติดเชื้อจึงจะนำอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นไปใช้เลี้ยงเซลล์ได้ สิ่งที่ต้องระวังว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เกิดการติดเชื้อคืออาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้น เมื่อนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นแบคทีเรียแปลกปลอมเต็มไปหมด

อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อที่เตรียมได้นี้จะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เมื่อต้องการใช้จึงจะเติม fetal bovine serum ให้มี % ตามที่ต้องการ

3. การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ หลังจากที่ได้สัณนิเทศแพทย์ทำการผ่าตัดผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและนำชิ้นเนื้อออกมาจากผู้ป่วยแล้ว แช่ล้างตัวอย่างชิ้นเนื้อในยาปฏิชีวนะที่ประกอบด้วย penicillin G sodium 50,000 unit และ streptomycin 0.1 กรัมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำชิ้นเนื้อไปใส่ใน sterile tube ขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์คือ DMEM ที่มียาปฏิชีวนะในความเข้มข้นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อขนย้ายไปยังห้องปฏิบัติการ⁽⁸¹⁻⁸³⁾

4. การเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อ เทคนิคทั้งหมดในการเพาะเลี้ยงต้องทำในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar airflow hood) นำชิ้นเนื้อที่อยู่ใน sterile tube 10 มิลลิลิตรจากข้อ 3 ออกมาหั่นละเอียดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยต้องหั่นด้วยใบมีดปราศจากเชื้อ (sterile blade) ให้เล็กที่สุดเท่าที่จะเล็กได้ และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase (ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันและเหมาะต่อการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนที่ตกตะกอนคือ เซลล์ไปเลี้ยงใน tissue cultured petridish ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี fetal calf serum 10 % และ epidermal growth factor 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นำ petridish ออกมาสังเกตดูเป็นครั้งคราว⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾

5. การศึกษาการแตกหักของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte จากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ นำตัวอย่างเลือด 200 ไมโครลิตรมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ชนิด RPMI 1640 ที่มี 20 % fetal bovine serum (FBS) และ phytohemagglutinin 2 % จำนวน 5 มิลลิลิตร) ใน tissue cultured petridish นำ tissue cultured petridish ไปเข้าตู้อบที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะมีเฉพาะเซลล์ lymphocyte ที่เจริญขึ้นมา

ต่อจากนั้นทำการเก็บเกี่ยว (harvest) เซลล์ด้วยการเติม colchicine 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ออบในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพาะเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วน supernatant ทิ้งไป ปั่นล้างเซลล์ให้สะอาดอีก 2 ครั้งด้วย Hank's balanced salt solution (HBSS) แล้วนำเซลล์ไปแช่ในสารละลาย hypotonic solution คือโปตัสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นต่อที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูด supernatant ซึ่งเป็นสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ทิ้งไป

ขั้นตอนต่อจากนี้จะทำให้เซลล์คงสภาพด้วยการเติมน้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative solution) ซึ่งประกอบด้วย methanol : acetic acid (3:1) จำนวน 5 มิลลิลิตร ประมาณ 30 นาที และปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที 10 นาที ดูด supernatant ทิ้งไป แล้วเติมน้ำยาคงสภาพเซลล์อีก 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นลักษณะเดิมให้เซลล์ตกตะกอนอีก ดูดส่วนน้ำใสทิ้งไป และเติมน้ำยาคงสภาพเซลล์ ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง ให้เซลล์ที่ก้นหลอดมีสีขาวสะอาด แล้วจึงนำ suspension ของเซลล์มาหยดลงบนสไลด์แห้งที่เช็ดล้างอย่างสะอาด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วแบ่งสไลด์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มแรก เป็นการย้อมแบบ G-banding จุ่มสไลด์ลงใน trypsin solution 0.025 % ก่อน ล้าง trypsin ออกด้วย phosphate buffer ผึ่งสไลด์ให้แห้ง แล้วจึงจุ่มสไลด์ลงใน Giemsa solution 5 % ใน phosphate buffer นาน 10 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และทิ้งให้แห้ง โครโมโซมจะติดสีเป็นแถบเข้มและจางสลับกัน มีลักษณะเฉพาะของโครโมโซมแต่ละคู่

- กลุ่มที่สอง เป็นการย้อมแบบ non-banding จุ่มสไลด์ลงใน Giemsa solution 5 % ใน phosphate buffer นาน 10 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และทิ้งให้แห้ง

6. การตรวจสอบสารอนุมูลอิสระในพลาสมา โดยการทำการวิเคราะห์สาร metabolite ของ lipid peroxides คือ malondialdehyde (MDA) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ และการคำนวณ แสดงไว้ในภาคผนวก^(51, 102)

7. การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ superoxide dismutase^(51, 103), glutathione peroxidase⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾, catalase⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾

และ glutathione^(51, 109-110) ใน hemolysate ดังรายละเอียด วิธีวิเคราะห์ และการคำนวณ แสดงไว้ในภาคผนวก

8. การวิเคราะห์การทำงานของเซลล์ตับ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase (AST) ในพลาสมา ดังรายละเอียด วิธีวิเคราะห์ และการคำนวณ แสดงไว้ในภาคผนวก⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾

9. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมา โดยทำการปั่นแยกพลาสมาวิเคราะห์ดังรายละเอียด วิธีวิเคราะห์ และการคำนวณ แสดงไว้ในภาคผนวก⁽¹¹⁶⁾

10. การศึกษาความเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่างของยาต้านไวรัส HIV ก่อนทำการผ่าตัดจะวัดความเป็นกรดต่างของน้ำปัสสาวะของผู้ป่วยๆ ก่อน หลังการทำผ่าตัดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแล้วจะใช้ยาต้านไวรัส HIV ในกระเพาะปัสสาวะผู้ป่วยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยจัดให้ผู้ป่วยนอนใน 4 ลักษณะคือ นอนหงาย นอนคว่ำหน้า นอนตะแคงซ้าย และนอนตะแคงขวา ลักษณะละครึ่งชั่วโมง เพื่อให้ตัวยาได้มีโอกาสสัมผัสกับเยื่อผิวกระเพาะปัสสาวะอย่างทั่วถึงทั้งกระเพาะปัสสาวะ แล้วจึงให้ผู้ป่วยปัสสาวะยาทิ้งไป และวัด pH ของยาต้านไวรัส HIV ที่ผู้ป่วยปัสสาวะออกมาหลังเสร็จสิ้นการรักษา

ขั้นตอนนี้มีได้ส่งผลกระทบใด ๆ ต่อผู้ป่วยเลย เนื่องจากการรักษาตามปกติอยู่แล้ว คณะผู้วิจัยมิได้เปลี่ยนแปลงการรักษาแต่อย่างใด เพียงแต่นำปัสสาวะ (ที่ผู้ป่วยต้องถ่ายทิ้งไปตามปกติอยู่แล้ว) มาวัด pH เท่านั้น

11. การวิเคราะห์ข้อมูล ระดับของสารต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้จะนำมาศึกษาทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยๆ ด้วยวิธี unpaired t test

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งจีน

การนำตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งทั้งก้อนมาศึกษาทางพันธุกรรมจะมีข้อเสีย เนื่องจากก้อนเนื้อมะเร็งจะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดปะปนกันอยู่ เช่น เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เซลล์ fibroblast เซลล์นิวฟิวลอคเลียด และอื่น ๆ จึงต้องทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์มะเร็งเท่านั้นมาทำการศึกษา การศึกษาพันธุกรรมของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะทำได้ 2 วิธีคือ

(1) นำชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งจีนมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้เป็น primary cell line คือ เลี้ยงเฉพาะเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะให้เจริญแยกออกมาจากเซลล์ชนิดอื่น ๆ ทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมาเลี้ยง ต่อจากนั้นจึงนำเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะไปถ่าย plate (passage) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี fetal calf serum 10 % เลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และศึกษาทางพันธุกรรมต่อไป วิธีนี้จะมีข้อเสีย คือ primary cell line ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานนัก เพียง 3-5 passage ก็อาจจะตายไป แต่ข้อดีก็คือจะได้เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจริงๆ ในจำนวนที่มากเพียงพอ ไม่มีการปนเปื้อนของเซลล์ชนิดอื่น ๆ ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾

(2) การคัดแยกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปกติพยาธิแพทย์จะใช้เทคนิคต่าง ๆ ตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ชิ้นเนื้อที่ทำการศึกษาต่อไปแล้วจะนำมาศึกษาต่อไม่ได้ จะต้องทำการแยกชิ้นเนื้อสด (ที่มีได้ย้อมสี) โดยอาศัย morphology ของเซลล์ ให้ได้เฉพาะเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจริง ซึ่งหากไม่ย้อมสีจะดูได้ลำบากมาก ดังนั้นข้อเสียของการคัดแยกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยวิธีนี้คืออาจปนเปื้อนเซลล์ชนิดอื่นมาได้ อีกทั้งการคัดแยกต้องทำในตู้ปราศจากเชื้อ (laminar air flow hood) มิฉะนั้นเซลล์ที่ได้ อาจมีการติดเชื้อได้ง่าย ทำให้การแปลผลโดยเฉพาะการศึกษาสารพันธุกรรมอาจมีปัญหาได้ นอกจากนี้เซลล์ที่ได้มักมีปริมาณน้อยอาจไม่แข็งแรงพอและตายได้ง่าย เนื่องจากขาดสารอาหารเป็นเวลานาน เซลล์ที่ได้จากการแยกวิธีนี้จึงมักจะไม่นำมาเลี้ยงต่อแล้ว แต่จะนำไปศึกษาต่อเลยเช่น สกัดหาปริมาณสารอนุมูลอิสระหรือสารต้านอนุมูลอิสระโดยตรงจากเซลล์ หรืออาจนำไปศึกษาด้วยวิธี comparative genomic hybridization เป็นต้น ⁽¹¹⁷⁻¹²⁰⁾

ในการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยเลือกการคัดแยกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยวิธีแรก เนื่องจากต้องการเซลล์จำนวนมากมาศึกษาทางพันธุกรรมบางชนิด โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามีโตมัยซินซี จำนวน 15 ราย ความหมายของคำว่า "ดื้อต่อยามีโตมัยซินซี" คือ การเกิดเนื้องอกขึ้นใหม่หลังจากให้ยามีโตมัยซินซีไปแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ 2 รายแรกมิได้แช่ตัวอย่างชิ้นเนื้อในยาปฏิชีวนะก่อนที่จะนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และอีก 3 รายแช่ตัวอย่างชิ้นเนื้อในยาปฏิชีวนะแต่ขนาดต่ำกว่าที่ระบุไว้ในระเบียบวิธีวิจัย จึงทำให้ชิ้นเนื้อทั้ง 5 ตัวอย่างแรกเกิดการติดเชื้อหลังจากนำมาเลี้ยงในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ ก็ไม่สามารถนำมาทดสอบใดๆ ต่อไปได้

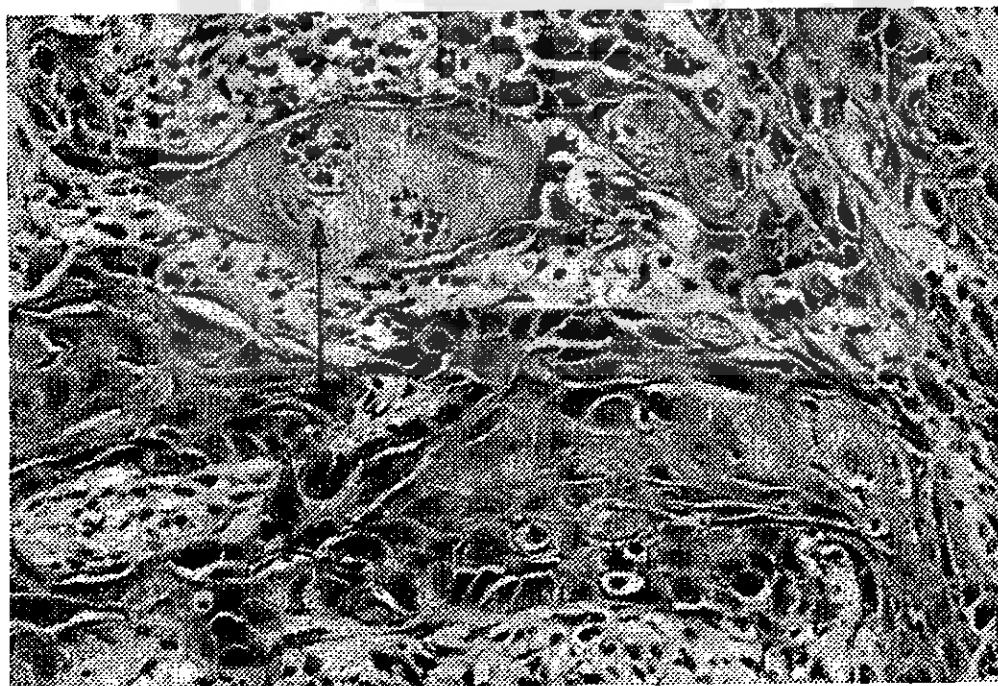
ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะอีก 10 รายจะแช่ในยาปฏิชีวนะตามที่ระบุไว้ในระเบียบวิธีวิจัย เซลล์ที่นำมาเลี้ยงจึงไม่มีการติดเชื้อมีดังเช่นใน 5 ตัวอย่างแรกอีก แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นเหมือนกันทั้ง 10 ตัวอย่างคือ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 2-3 วันในตู้บคาร์บอนไดออกไซด์จะมีเซลล์ fibroblast จำนวนมากเจริญขึ้นมาเต็ม tissue cultured petridish โดยแทบจะไม่พบเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และเซลล์ที่คาดว่าจะจะเป็นเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะก็ตายง่ายมาก ไม่สามารถแยกออกมาเลี้ยงให้เจริญเป็น primary cell line ได้

เมื่อทำการศึกษาย้อนหลังรายงานการเพาะเลี้ยง primary cell line ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะก็พบว่า รายงานการวิจัยทั้งหมดใช้เซลล์มะเร็งในระยะแรก ๆ ที่มีลักษณะ well differentiation เท่านั้น⁽¹²¹⁻¹²⁶⁾ และเมื่อศึกษาการนำเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่มี grade สูง เช่น grade II ขึ้นไปหรือ grade III มักจะเป็นการนำก้อนเนื้อมาศึกษาโดยตรง เช่น ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน⁽¹¹⁷⁻¹²⁰⁾ คณะผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่จะสามารถนำมาแยกเลี้ยงจนประสบความสำเร็จน่าจะมาจากชิ้นเนื้อที่อยู่ในระยะแรก เช่น TIS เนื่องจากเซลล์ประเภทนี้จะมีลักษณะ well differentiation แต่เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากชิ้นเนื้อในระยะหลังกว่านี้จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันคือเป็นแบบ poor differentiation ทำให้เซลล์เหล่านี้เจริญใน tissue cultured plate ไปเป็น primary cell line ได้ยาก

ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะอีก 10 ราย เป็นชิ้นเนื้อที่พยาธิแพทย์รายงานผลว่าอยู่ในระยะ T1 หรือ T1 ปลาย ๆ และบางรายกำลังระหว่างมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC และ IBC หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในระยะท้าย ๆ ก่อนกลายเป็นชนิด IBC คณะผู้วิจัยได้พยายามอย่างยิ่งที่จะหาชิ้นเนื้อมะเร็ง

กระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งในในระยะเริ่มแรกเช่น ระยะ TIS แต่ก็ทำได้ยากมากในช่วงระยะที่ทำการวิจัย ก่อนเนื้อมะเร็งที่ได้มามักจะอยู่ในระยะ T1 หรือ T1 ปลาย ๆ เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้จึงมีการเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่ำมาก ๆ เนื่องจากพัฒนาการของเซลล์ในระยะนี้จะไม่ดี (poor differentiation) ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อแต่ละครั้งจะได้เซลล์ fibroblast จำนวนมากเจริญดูกลามขึ้นมาแทนเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จนไม่สามารถคัดแยกหาเซลล์มะเร็งที่ต้องการออกมาได้

ดังนั้นการศึกษางานชนิดที่คาดว่าจะทำ เช่น ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนคือยา คือ multidrug resistant gene หรือ MDR gene และยีนที่ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (tumor suppressor gene) คือ p53 gene จึงทำไม่ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมาเลี้ยงเป็น primary cell line ได้ ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านมะเร็งในโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นไปที่การวิเคราะห์ระบบ oxidation-antioxidation ในกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งปัจจุบันมีผู้สนใจกันมากขึ้นและเริ่มมีรายงานในต่างประเทศออกมาบ้างแล้วแต่เป็นการศึกษาจากก้อนเนื้อมะเร็งโดยตรง มิใช่ในเลือดผู้ป่วย



ภาพ 3 แสดงลักษณะเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะระยะเริ่มต้น (บริเวณลูกศรบาง) ที่เหมาะต่อการนำมาแยกเลี้ยงเป็น primary cell culture⁽¹²⁷⁾

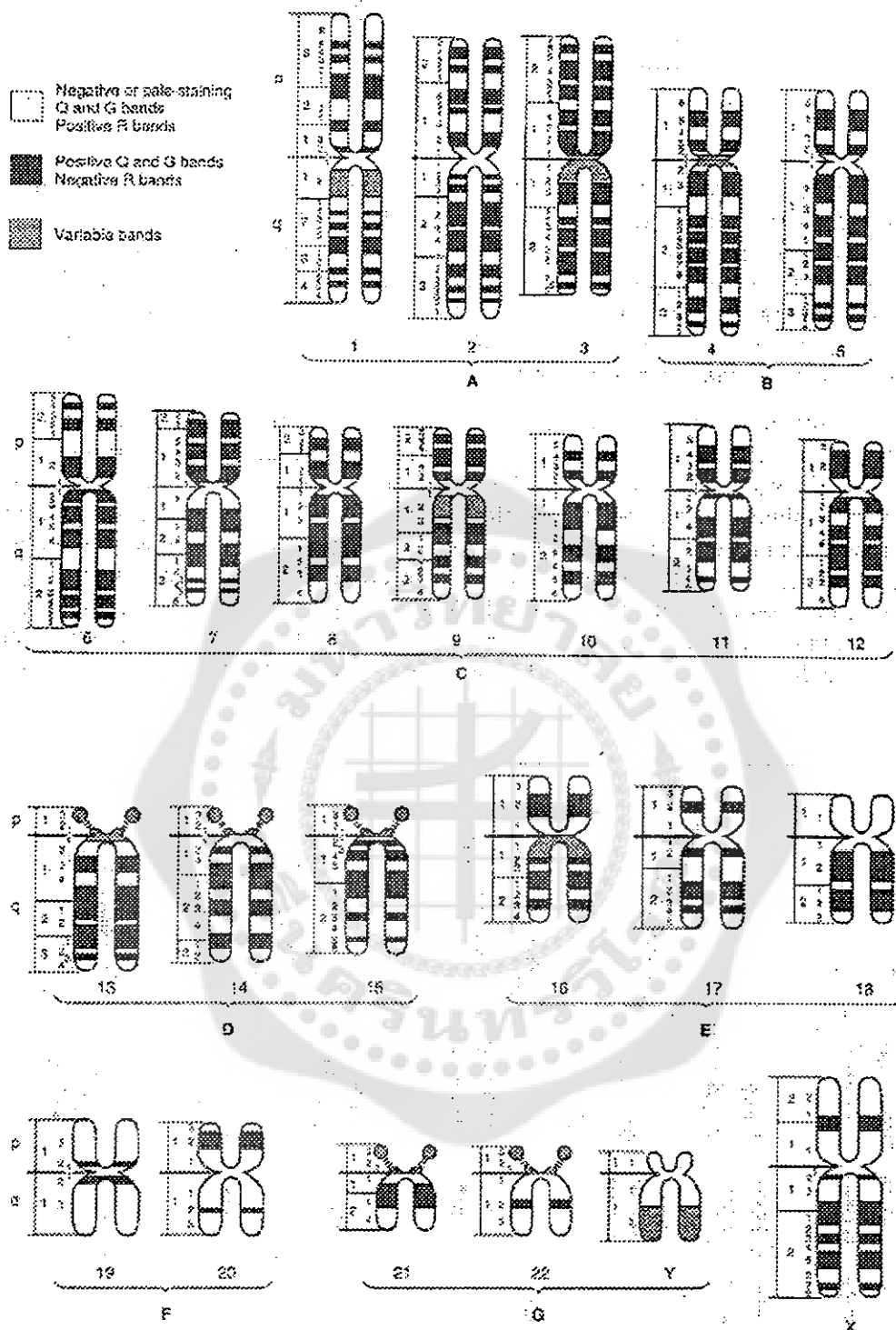
การศึกษาการแตกหักของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte จากผู้ป่วยมะเร็งฯ

ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซมของเซลล์ lymphocyte ที่ใช้ colchicine ช่วยในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบ mitosis หยุดอยู่ที่ระยะ metaphase เป็นส่วนใหญ่ โครโมโซมที่ได้ในระยะนี้มีลักษณะหดสั้นและเห็นรูปร่างได้ชัดเจน ต่อจากนั้นจึงทำให้เซลล์พองตัวโดยแช่ในสารละลาย hypotonic ของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ โครโมโซมภายในเซลล์จะกระจายตัวดีและง่ายต่อการศึกษาภายหลังการย้อมสี

โครโมโซมที่ได้รับการย้อมสี Giemsa's ในลักษณะ G-banding จะสามารถนำมาแยกและบ่งบอกว่าเป็นโครโมโซมแท่งใดได้ เนื่องจากโครโมโซมแต่ละแท่งมีการติดสีเฉพาะ⁽⁹⁹⁻¹⁰⁰⁾ อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ มีลักษณะของโครโมโซมเป็นปกติคือไม่มีความแตกต่างกัน

ในกรณีที่ต้องการศึกษาการแตกหักของโครโมโซม จะต้องย้อมในลักษณะ non-banding เพื่อให้การพิจารณาลักษณะการแตกหักมองเห็นได้อย่างชัดเจน ขณะเดียวกันการย้อมแบบ non-banding ทำให้ไม่สามารถแยกระบุชัดเจนไปว่าเป็นโครโมโซมแท่งใดได้ เพียงแต่ระบุได้คร่าว ๆ ว่าเป็นโครโมโซมกลุ่ม A, B, C หรือ D เท่านั้น การแบ่งกลุ่มโครโมโซมจาก A ไป G จะมีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ ดังนี้⁽¹²⁸⁻¹²⁹⁾

- กลุ่ม A หมายถึงคู่ที่ 1 - 3 เป็น metacentric chromosome มีขนาดใหญ่ที่สุด
 - กลุ่ม B หมายถึงคู่ที่ 4 - 5 เป็น submetacentric chromosome มีขนาดใหญ่
 - กลุ่ม C หมายถึงคู่ที่ 6 - 12 เป็น submetacentric chromosome ขนาดกลาง ๆ
- โครโมโซม X จัดรวมไว้ในกลุ่มนี้ด้วย
- กลุ่ม D หมายถึงคู่ที่ 13 - 15 เป็น acrocentric chromosome ขนาดกลาง ๆ ที่มีส่วน satellite อยู่ด้วย
 - กลุ่ม E หมายถึงคู่ที่ 16 - 18 มีขนาดสั้น โดยโครโมโซมคู่ที่ 16 มี metacentric centromere สำหรับคู่ที่ 17 - 18 มี submetacentric centromere
 - กลุ่ม F หมายถึงคู่ที่ 19 - 20 เป็น metacentric chromosome ที่มีขนาดสั้น
 - กลุ่ม G หมายถึงคู่ที่ 21 - 22 เป็น acrocentric chromosome ที่มีขนาดสั้นมากและมีส่วน satellite DNA อยู่ด้วย



ภาพ 4 แสดงลักษณะของโครโมโซมปกติของมนุษย์ และการจัด
แบ่งกลุ่ม A - G⁽¹²⁸⁾

การตรวจนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะ metaphase เท่านั้น โดยวิธีการนับจะคิดจำนวนหักของโครโมโซม ต่อ metaphase cell 50 เซลล์ โดยศึกษาการหักในลักษณะต่อไปนี้^(99, 100, 130)

- Single chromatid gap (SG) คือ ความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างในส่วน chromatid แห่งใดแห่งหนึ่ง แต่ไม่ขาดแยกออกจากกัน นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

- Isochromatid gap (ISCG) คือ ความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างในส่วน chromatid ทั้งสองแห่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดแยกออกจากกัน นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

- Single chromatid break (SB) คือ ความผิดปกติที่ chromatid แห่งหนึ่ง หักขาดแยกออกจากกัน นับเป็น 1 หักต่อ 1 SB

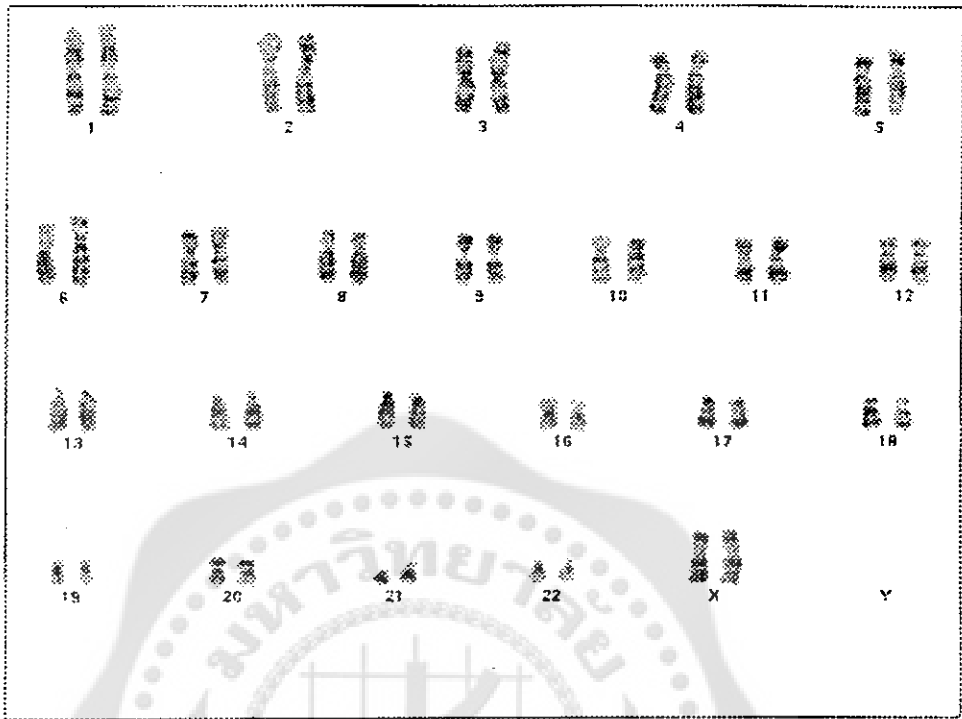
- Isochromatid break (ISCB) คือ ความผิดปกติที่ chromatid ทั้งสองแห่งบนโครโมโซมเดียวกันหักแยกออกจากกัน นับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

- Translocation คือ ความผิดปกติที่มีการหักและต่อสลับของโครโมโซมต่างคู่กัน นับเป็น 4 หักต่อ 1 translocation

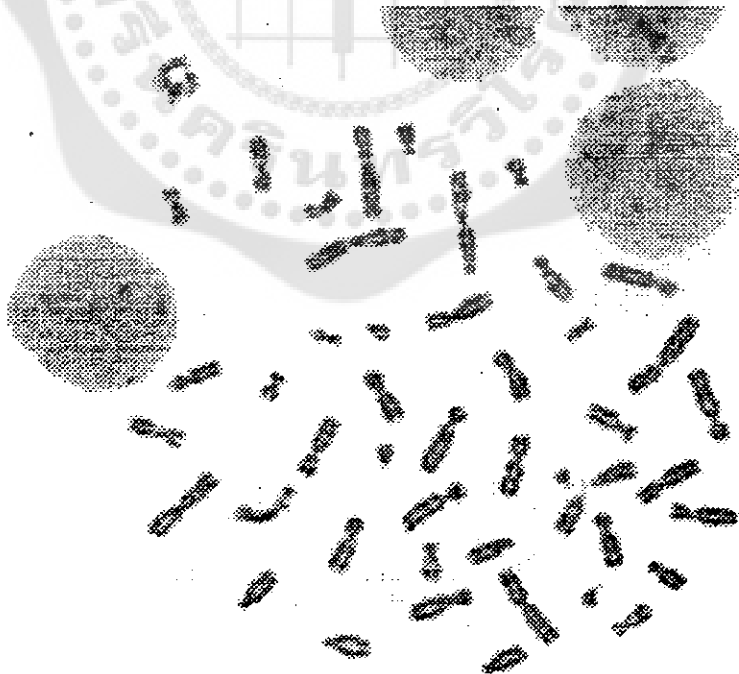
- Deletion คือ ความผิดปกติที่เนื้อโครโมโซมขาดหายไปจากแขนข้างใดข้างหนึ่ง นับเป็น 1 หักต่อ 1 deletion

การศึกษาการแตกหักของโครโมโซมในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะเห็นได้ชัดเจน⁽¹³¹⁻¹³⁶⁾ แต่การแตกหักของโครโมโซมในเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ (ซึ่งถือว่าเป็นเซลล์ปกติ แม้จะเป็นของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะก็ตาม) เปรียบเทียบกับคนปกติจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกล่าวคือ คนปกติจำนวน 11 รายจะมีอัตราการแตกหักของโครโมโซม 3 ± 2 หักต่อ 50 metaphase cell ในขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง 16 รายมีอัตราการแตกหักของโครโมโซม 3 ± 2 หักต่อ 50 metaphase cell เช่นเดียวกัน โดยการแตกหักที่พบในโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ เป็นแบบสุ่ม (random) คือ ไม่แตกหักซ้ำที่เดียวกันหรือโครโมโซมกลุ่มเดียวกัน

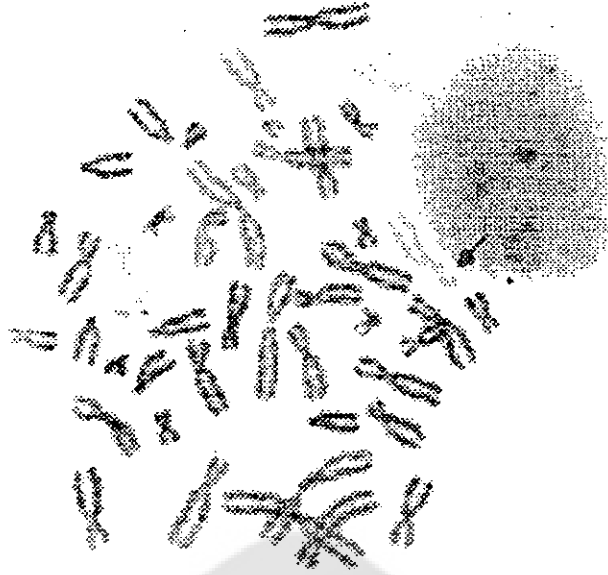
5.1



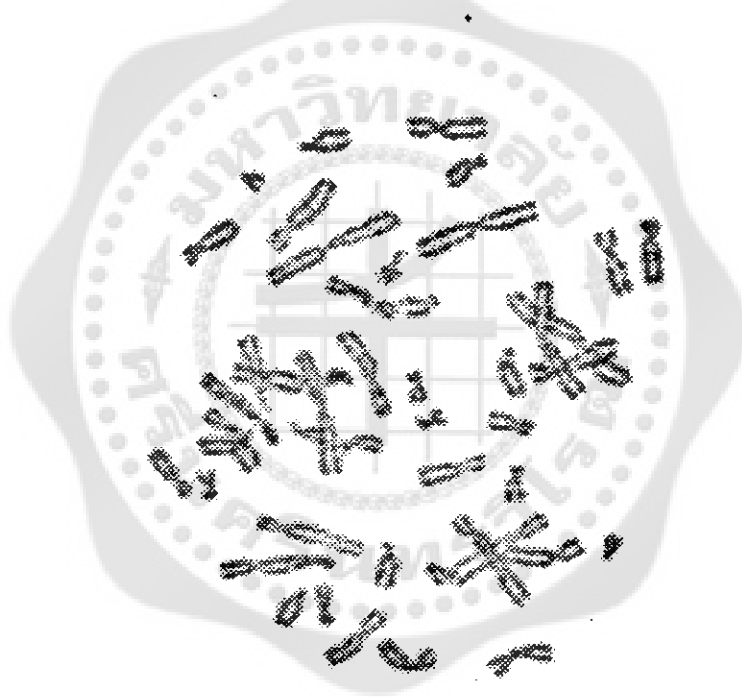
5.2



5.3



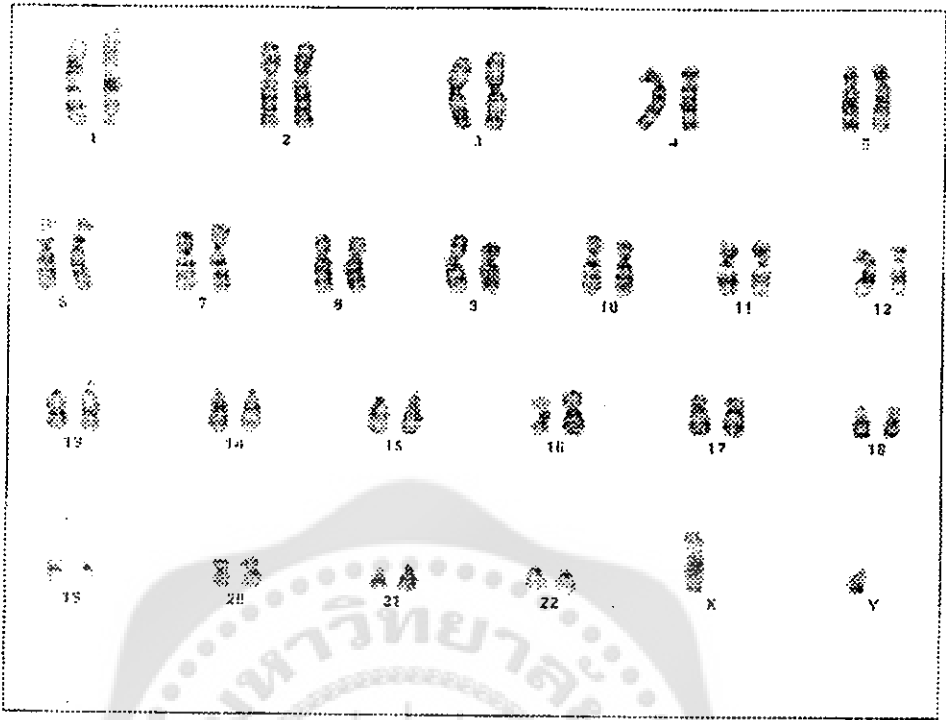
5.4



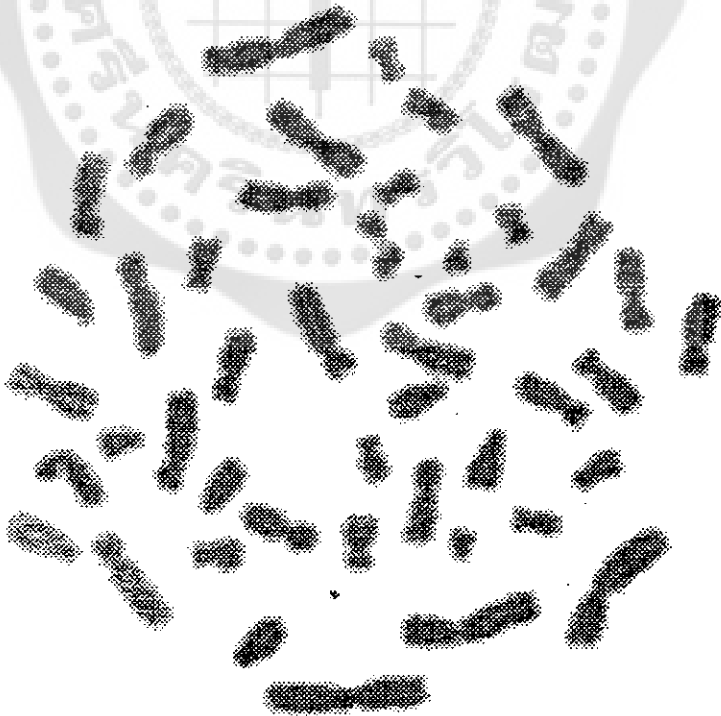
ภาพ 5 แสดงการย้อมโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของอาสาสมัครปกติหญิง ด้วยสี Giemsa's ใน 2 ลักษณะ คือ

- ลักษณะของ G-banding ในภาพ 5.1
- ลักษณะ non-banding ในภาพ 5.2, 5.3 และ 5.4
 - ภาพ 5.1 แสดงโครโมโซมคนปกติที่ไม่มีการแตกหัก
 - ภาพ 5.2 แสดงการแตกหักแบบ gap 1 แห่งบนโครโมโซมกลุ่ม C (ศรชี้)
 - ภาพ 5.3 แสดงการแตกหักแบบ break 1 แห่งบนโครโมโซมกลุ่ม C (ศรชี้)

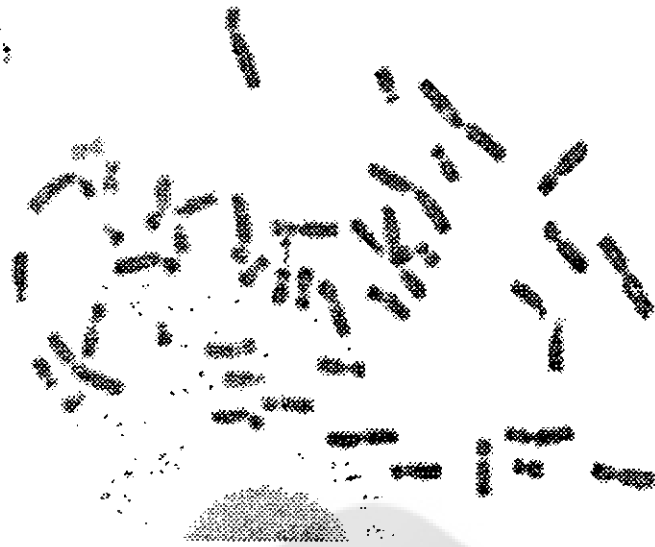
6.1



6.2



6.3



6.4



ภาพ 6 แสดงการย้อมโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยชายที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ด้วยสี Giemsa's ใน 2 ลักษณะ คือ

- ลักษณะของ G-banding ในภาพ 6.1
- ลักษณะ non-banding ในภาพ 6.2, 6.3 และ 6.4
 - ภาพ 6.1 แสดงโครโมโซมคนปกติที่ไม่มีการแตกหัก
 - ภาพ 6.2 แสดงการแตกหักแบบ break 1 แห่งบนโครโมโซมกลุ่ม C (ศรีษะ)
 - ภาพ 6.3 แสดงการแตกหักแบบ gap 1 แห่งบนโครโมโซมกลุ่ม A (ศรีษะ)

โดยสรุปก็คือมีการแตกหักน้อยและไม่ซ้ำที่เดียวกันทั้งในอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่ว่าความผิดปกติของโครโมโซมจะพบได้เฉพาะที่เซลล์มะเร็งเท่านั้น และเซลล์ lymphocyte ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ยังคงสภาพปกติ จึงไม่สามารถตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์ lymphocyte ที่ใช้เป็น marker ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ด้วยวิธีนี้

การวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระในพลาสมา

สารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดของคนปกติจำนวน 11 ราย มีความเข้มข้นของ MDA 0.336 ± 0.086 ไมโครโมลต่อลิตรพลาสมา กราฟในภาพ 7 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยจำนวน 16 รายมีระดับของสารอนุมูลอิสระสูงประมาณ 2 เท่าของคนปกติคือ สูงถึง 0.709 ± 0.192 ไมโครโมลต่อลิตรพลาสมา และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ตาราง 2 เปรียบเทียบปริมาณสารอนุมูลอิสระในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้³⁽¹³⁷⁻¹³⁸⁾

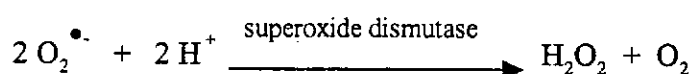
ประเภทบุคคล	% MDA
คนปกติ	100.00
เบาหวาน	105.17
เบาหวาน + hypertriglyceridemia	131.90
เบาหวาน + hyperlipidemia	118.10
Parkinson’s disease (motor fluctuation)	134.01
Parkinson’s disease (non motor fluctuation)	123.05
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ	211.01

ตาราง 2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดที่พบในโรคอื่นของผู้ป่วยในประเทศไทยหลาย ๆ ประเภทเช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีไขมัน triglyceride สูง (hypertriglyceridemia) ผู้ป่วยเบาหวานที่มีไขมันในหลอดเลือดสูง (hyperlipidemia) และผู้ป่วยโรค Parkinson's disease เนื่องจากการวิเคราะห์ในแต่ละห้องปฏิบัติการใช้หน่วยต่างกัน วิธีการ รวมทั้งผู้วิเคราะห์ก็ต่างเวลาและต่างสถานที่กัน คณะผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบในตาราง 2 โดยปรับให้ค่าปริมาณสารอนุมูลอิสระ (ซึ่งทุกห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สาร MDA เช่นเดียวกัน) ของคนปกติมีค่าเป็น 100 % เท่ากันเพื่อสะดวกในการนำมาเปรียบเทียบ จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยเหล่านี้จะมีระดับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าคนปกติไม่มากนัก ซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งที่มีปริมาณสารอนุมูลอิสระสูงอย่างชัดเจนเป็น 2 เท่าของคนปกติ

แม้ว่าบทบาทของสารอนุมูลอิสระต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะยังไม่อาจสรุปได้ในเวลานี้ แต่คณะผู้วิจัยก็พอจะมองภาพได้กว้าง ๆ และสันนิษฐานจากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดได้ว่า สารอนุมูลอิสระน่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องในเรื่องของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็ง สารกลุ่มอนุมูลอิสระที่เกิดจาก oxidative stress สามารถก่อให้เกิดการทำลายและกลายพันธุ์ของเซลล์จนนำไปสู่การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะขึ้นแล้วก็ยังมีสารอนุมูลอิสระมากขึ้น โดยสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้ส่วนหนึ่งมีผลทำลายและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ สารอนุมูลอิสระอีกส่วนหนึ่งอาจมีผลกระตุ้นกลไกภูมิคุ้มกันของร่างกายให้หลั่งสารบางอย่างมาควบคุมและจำกัดการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้⁽⁵⁵⁻⁶⁷⁾

การวิเคราะห์ superoxide dismutase (SOD) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$) จัดเป็นสารอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นอย่างมาก เกิดมาจากหลายแหล่งทั้งเมตาบอลิซึมปกติในร่างกายหรือจากการฉายรังสี ยา และสารพิษต่าง ๆ สารอนุมูลอิสระชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายมากมาย มีการทำลายสาร DNA เร่งการแก่ และการเกิดมะเร็ง เป็นต้น เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่เร่งกระบวนการสลาย superoxide anion ไปเป็น oxygen และ hydrogen peroxide ดังสมการต่อไปนี้⁽⁵⁰⁾



ตาราง 3 เปรียบเทียบปริมาณ SOD ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรค มะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศ ไทยที่เคยมีรายงานไว้⁽¹³⁷⁻¹³⁸⁾

ประเภทบุคคล	% SOD
คนปกติ	100.00
เบาหวาน	101.47
เบาหวาน + hypertriglyceridemia	103.86
เบาหวาน + hyperlipidemia	104.62
Parkinson's disease (motor fluctuation)	37.28
Parkinson's disease (non motor fluctuation)	108.65
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ	57.80

การวิเคราะห์ SOD activity ทำได้โดยการสกัดแยกเอนไซม์ SOD ด้วย ethanol และ chloroform ก่อน ต่อจากนั้นจึงศึกษาความสามารถของ SOD ในยับยั้งกระบวนการเปลี่ยน NBT^{2+} เป็นสาร blue formazan หลังจากการสัมผัสกับแสงไฟในกล่องแสง หากมีสีน้ำเงินของสาร blue formazan เกิดขึ้นมาก แสดงว่า SOD activity มีค่าต่ำ การเปรียบเทียบ SOD activity จะคำนวณค่า 50 % inhibition ของแต่ละตัวอย่างแล้วมาเปรียบเทียบกัน

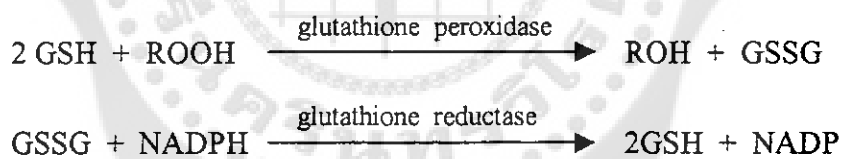
เมื่อทำการวิเคราะห์ SOD activity พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จะมี SOD activity ต่ำกว่าอาสาสมัครปกติประมาณ 42 % คือ อาสาสมัครปกติและผู้ป่วย มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมี SOD activity 1.263 ± 0.280 และ 0.730 ± 0.170 unit ต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน ตามลำดับ (กราฟในภาพ 8) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย-สำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณ SOD ของเนื้อเยื่อ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะธรรมดาในอดีตที่มี SOD ต่ำกว่าเซลล์บุผิวกระเพาะปัสสาวะ

ปกติ⁽⁷⁴⁾ ทำให้คณะผู้วิจัยค่อนข้างมั่นใจว่า SOD ของผู้ป่วยถูกใช้ไปในกระบวนการสลาย superoxide anion ที่เกิดขึ้น แต่อาจไม่มากจนถึงขนาดที่ร่างกายจะต้องปรับตัวเพื่อเพิ่มการสังเคราะห์ SOD นั้นหมายถึงว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะกล่าวว่ามีมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ อาจมีสารอนุมูลอิสระประเภท superoxide anion อยู่เป็นจำนวนหนึ่ง

เมื่อพิจารณาจากตาราง 3 จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยในประเทศไทยในกลุ่มโรคเบาหวาน ไ้มนในหลอดเลือดสูง หรือ Parkinson's disease ชนิด non motor fluctuation จะมีปริมาณ SOD ในเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างจากปกติมากนัก แต่ Parkinson's disease ชนิด motor fluctuation และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งชนิดที่มีปริมาณ SOD ต่ำกว่าคนปกติอย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ glutathione peroxidase (GPx) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

Glutathione peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ใช้สลาย hydroperoxides (ROOH) โดยเร่งกระบวนการ reduction ของ hydroperoxides และ reduced glutathione (GSH) ไปเป็น alcohol และ oxidized glutathione (GSSG) ต่อจากนั้นเซลล์จะมีเอนไซม์ glutathione reductase มาเปลี่ยน GSSG และ NADPH กลับไปเป็น GSH และ NADP จึงกล่าวได้ว่า GPx เป็นเอนไซม์สำคัญในการสลายสาร hydroperoxides ดังสมการ⁽⁵⁰⁾



การวิเคราะห์ GPx activity จึงทำได้โดยจัดระบบ (reaction mixture) ให้มี GSH, ROOH, NADPH และ glutathione reductase แล้วใส่ตัวอย่าง hemolysate เพื่อวัดอัตราการลดลงของ NADPH ใน 1 นาที หาก NADPH ลดลงมาก แสดงว่าในตัวอย่าง hemolysate นั้นมีเอนไซม์ GPx activity อยู่มาก

ผลจากการวิเคราะห์ GPx activity พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มี GPx activity สูงกว่าคนปกติถึง 2.5 เท่า คือ ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มีค่า 0.806 ± 0.091 และ 1.966 ± 0.241 ไมโครโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อ นาที ตามลำดับ (กราฟในภาพ 9) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ซึ่งตรงกับรายงานจาก Singh และคณะในปี 1994 ว่า ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมี GPx มีปริมาณสูงกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะปกติ 1.5 เท่า⁽⁷⁶⁾

ก็อาจเป็นไปได้ว่าการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะก่อให้เกิดสาร hydroperoxides มากมายจนเซลล์ต้องปรับตัวเพิ่ม GPx มากำจัด hydroperoxides เหล่านี้

อย่างไรก็ตามมีรายงานในด้านที่ขัดแย้งกันว่า GPx ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปศุสัตว์ที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีค่าต่ำ⁽⁷⁸⁾ และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีค่า GPx activity ต่ำ⁽⁷⁷⁾ อีกทั้ง Xu และคณะ ในปี 1994 ก็รายงานว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อยาต้านไวรัสจะมี GPx ไม่ต่างจากเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะธรรมดา⁽⁹²⁾ คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าในกรณีของ Xu เซลล์อาจเผชิญกับ hydroperoxide ไม่มากนัก GPx บางส่วนถูกใช้ไปแล้วยังเหลืออยู่ในปริมาณที่เพียงพอ ร่างกายจึงมิได้ปรับตัวสร้างขึ้นใหม่

ตาราง 4 เปรียบเทียบปริมาณ GPx ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้⁽¹³⁷⁻¹³⁸⁾

ประเภทบุคคล	% GPx
คนปกติ	100.00
เบาหวาน	116.09
เบาหวาน + hypertriglyceridemia	108.29
เบาหวาน + hyperlipidemia	104.62
Parkinson's disease (motor fluctuation)	47.43
Parkinson's disease (non motor fluctuation)	80.72
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	243.92

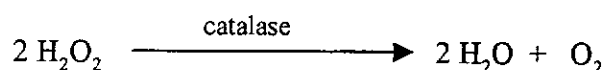
เมื่อพิจารณาจากตาราง 4 จะเห็นได้ว่า GPx ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะต่างจากผู้ป่วยในประเทศไทยในกลุ่มโรคอื่นอย่างชัดเจนคือมีปริมาณเพิ่มสูงมาก

ตาราง 5 เปรียบเทียบปริมาณ catalase ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานไว้⁽¹³⁷⁻¹³⁸⁾

ประเภทบุคคล	% catalase
คนปกติ	100.00
เบาหวาน	91.38
เบาหวาน + hypertriglyceridemia	99.06
เบาหวาน + hyperlipidemia	98.81
Parkinson's disease (motor fluctuation)	65.05
Parkinson's disease (non motor fluctuation)	98.06
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	49.07

การวิเคราะห์ catalase ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การทำงานของเอนไซม์ catalase จะเร่งกระบวนการสลาย hydrogen peroxide ไปเป็นน้ำ หลักการตรวจสอบ catalase activity จึงอาศัยการลดปริมาณของ hydrogen peroxide เป็นมิลลิโมลาร์ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (คือ 1 นาที) ค่อน้ำหนักซีโมโกลบิน⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾



รายงานในอดีตที่กล่าวถึงเอนไซม์ catalase ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีทั้งในทางที่เพิ่มขึ้นและลดลง Durak และคณะกล่าวว่า catalase activity ของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับต่ำกว่าเซลล์กระเพาะปัสสาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁷⁴⁾ ขณะที่ Xu และคณะรายงานไว้ว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามะ-

โคมัยซินซีจะมี catalase activity สูงกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แม้จะไม่มากนัก แต่ก็มีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁹²⁾ แต่รายงานฉบับนี้เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อยาต้านมะเร็งโคมัยซินซีกับเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะปกติ มิใช่กับเซลล์กระเพาะปัสสาวะปกติหรือเซลล์ธรรมดา อย่างไรก็ตาม Singh และคณะได้เปรียบเทียบ catalase activity เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและพบว่ามีสูงกว่าเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะปกติประมาณ 1-4 เท่า⁽⁷⁶⁾

สำหรับในโครงการวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบ catalase activity ในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งโคมัยซินซีกับคนปกติ กราฟในภาพ 10 แสดงให้เห็นว่า อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยฯ มี catalase activity 85.953 ± 9.830 และ 42.177 ± 7.220 มิลลิโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อนาที ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยคนปกติมีค่าสูงกว่าประมาณ 2 เท่า ก็อาจเป็นไปได้ว่าเกิดสาร hydrogen peroxide จำนวนมากกว่าปกติที่ร่างกายจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ catalase ไปกำจัดออก

เมื่อพิจารณาจากตาราง 5 จะเห็นได้ว่า ปริมาณ catalase ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จะต่างจากผู้ป่วยในประเทศไทยในกลุ่มโรคอื่นอย่างชัดเจนคือ มีปริมาณลดลงต่ำกว่าอาสาสมัครปกติมากเป็นครึ่งหนึ่งของคนปกติ

การวิเคราะห์ glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

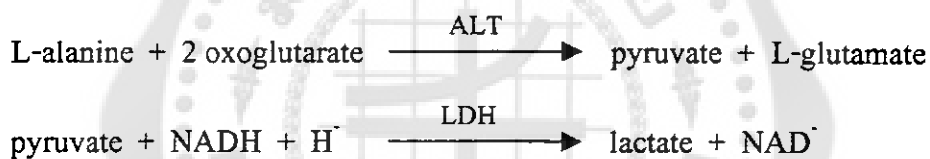
glutathione เป็นสารกลุ่ม thiol ที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง จะอยู่ในกระบวนการเปลี่ยน hydroperoxide เป็นแอลกอฮอล์ดังกล่าวมาแล้ว การวิเคราะห์ glutathione ใช้การตรวจสอบการเปลี่ยนสีของ DTNB เทียบกับสาร glutathione มาตรฐาน

ในโครงการวิจัยนี้พบว่าปริมาณ glutathione ในอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ มีค่า 77.593 ± 5.011 และ 59.199 ± 9.001 นาโนโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน ตามลำดับ (กราฟในภาพ 11) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ปกติการมีระดับ glutathione ต่ำจะบ่งบอกเป็นนัยว่าร่างกายจะไว (sensitive) ต่อสารอนุมูลอิสระและมีโอกาสเป็นมะเร็งได้สูงกว่าปกติ อาจเนื่องมาจากการเกิดมะเร็งมีความสัมพันธ์กับการมีสารอนุมูลปริมาณสูงหรือมากกว่าปกติ ร่างกายจำเป็นต้องใช้ glutathione peroxidase ในการกำจัดสารอนุมูลที่เกิดขึ้น ซึ่งการทำงานของ

glutathione peroxidase จำเป็นต้องใช้ glutathione ทำให้ระดับของ glutathione ต่ำกว่าปกติได้⁽⁷³⁾

การวิเคราะห์ alanine transaminase (ALT) ในพลาสมา

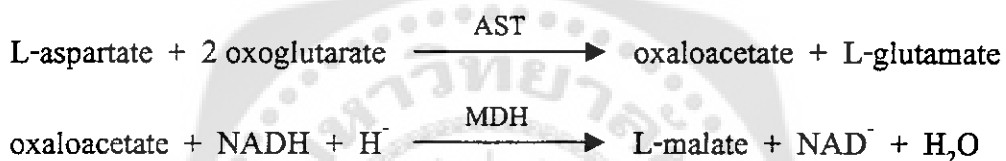
การตรวจสอบเอนไซม์ ALT ใช้ laboratory kit ของบริษัท Chiron ที่ได้รับการยอมรับว่ามีความเที่ยงตรงสูง⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾ หลักการวิเคราะห์อาศัยความสามารถของ ALT ในการเร่งการถ่ายกลุ่มอะมิโน (amino group) จาก L-alanine ไปยัง 2-oxoglutarate เกิดเป็น pyruvate และ L-glutamate ต่อจากนั้นเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เร่งปฏิกิริยา reduction ของ pyruvate และ oxidation ของ NADH เป็น NAD⁺ อัตราการเกิด NAD⁺ จะแปรตามค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร การลดค่าการดูดกลืนแสงแสดงว่ามีการสังเคราะห์ NAD⁺ มากขึ้น นั่นคือ ALT activity มีค่าสูงนั่นเอง ดังนั้น reagent solution ที่ใช้ผสมกับพลาสมาจึงประกอบด้วย L-alanine, 2-oxoglutarate, NADH และ LDH



เอนไซม์ ALT เป็นเอนไซม์ที่มาจากตับที่บ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของตับ หากมีเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มากในกระแสเลือดก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตับมีสภาพแย่ง ประเด็นสำคัญคือ โรคตับเรื้อรังสามารถเป็นสาเหตุของการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดได้ การวิจัยในส่วนนี้ทำเพื่อยืนยันว่าตับของผู้ป่วยปกติยังอยู่ในสภาพดี ไม่เป็นบ่อเกิดของสารอนุมูลอิสระเสียเอง ซึ่งผลการวิจัยก็แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยกลุ่มที่คัดเลือกมามีเอนไซม์ ALT ไม่ต่างจากคนปกติคือ ตับยังอยู่ในสภาพดี โดยอาสาสมัครปกติมีปริมาณเอนไซม์ ALT ในกระแสเลือด 23.015 ± 5.400 และ 22.582 ± 3.818 unit ต่อลิตรพลาสมา ตามลำดับ (กราฟในภาพ 12) และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.677$) ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่อนุญาตให้มีเอนไซม์ ALT ในกระแสเลือดได้ไม่เกิน 40 unit ต่อลิตรพลาสมา ทั้งนี้อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ในโครงการนี้ ทุกคนมีเอนไซม์ ALT ต่ำกว่า 40 unit ต่อลิตรพลาสมา

การวิเคราะห์ aspartate transaminase (AST) ในพลาสมา

การตรวจสอบเอนไซม์ AST ใช้ laboratory kit ของบริษัท Chiron ที่ได้รับการยอมรับว่ามีความเที่ยงตรงสูง⁽¹¹¹⁻¹¹⁵⁾ หลักการวิเคราะห์อาศัยความสามารถของ AST ในการเร่งการถ่ายกลุ่มอะมิโน (amino group) จาก L-aspartate ไปยัง 2-oxoglutarate เกิดเป็น oxaloacetate และ L-glutamate ต่อจากนั้นเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) เร่งปฏิกิริยา reduction ของ oxaloacetate และ oxidation ของ NADH เป็น NAD⁺ อัตราการเกิด NAD⁺ จะแปรตามค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร การลดค่าการดูดกลืนแสงแสดงว่ามีการสังเคราะห์ NAD⁺ มากขึ้น นั่นคือ AST activity มีค่าสูงนั่นเอง ดังนั้น reagent solution ที่ใช้ผสมกับพลาสมาจึงประกอบด้วย L-aspartate, 2-oxoglutarate, NADH และ MDH



เอนไซม์ AST เป็นเอนไซม์ที่มาจากตับที่บ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของตับ หากมีเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มากในกระแสเลือดก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตับมีสภาพเยี่ยงประเด็นสำคัญคือ โรคตับเรื้อรังสามารถเป็นสาเหตุของการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดได้ การวิจัยในส่วนนี้ทำเพื่อยืนยันว่าตับของผู้ป่วยปกติยังอยู่ในสภาพดี ไม่เป็นบ่อเกิดของสารอนุมูลอิสระเสียเอง ซึ่งผลการวิจัยก็แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยกลุ่มที่คัดเลือกมาเอนไซม์ AST ไม่ต่างจากคนปกติคือ ตับยังอยู่ในสภาพดี โดยอาสาสมัครปกติมีปริมาณเอนไซม์ AST ในกระแสเลือด 21.904 ± 4.442 และ 22.698 ± 3.818 unit ต่อลิตรพลาสมา ตามลำดับ (กราฟในภาพ 13) และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.548$) ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่อนุญาตให้มีเอนไซม์ AST ในกระแสเลือดได้ไม่เกิน 40 unit ต่อลิตรพลาสมา ทั้งนี้อาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ ในโครงการนี้ ทุกคนมีเอนไซม์ AST ต่ำกว่า 40 unit ต่อลิตรพลาสมา

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมา

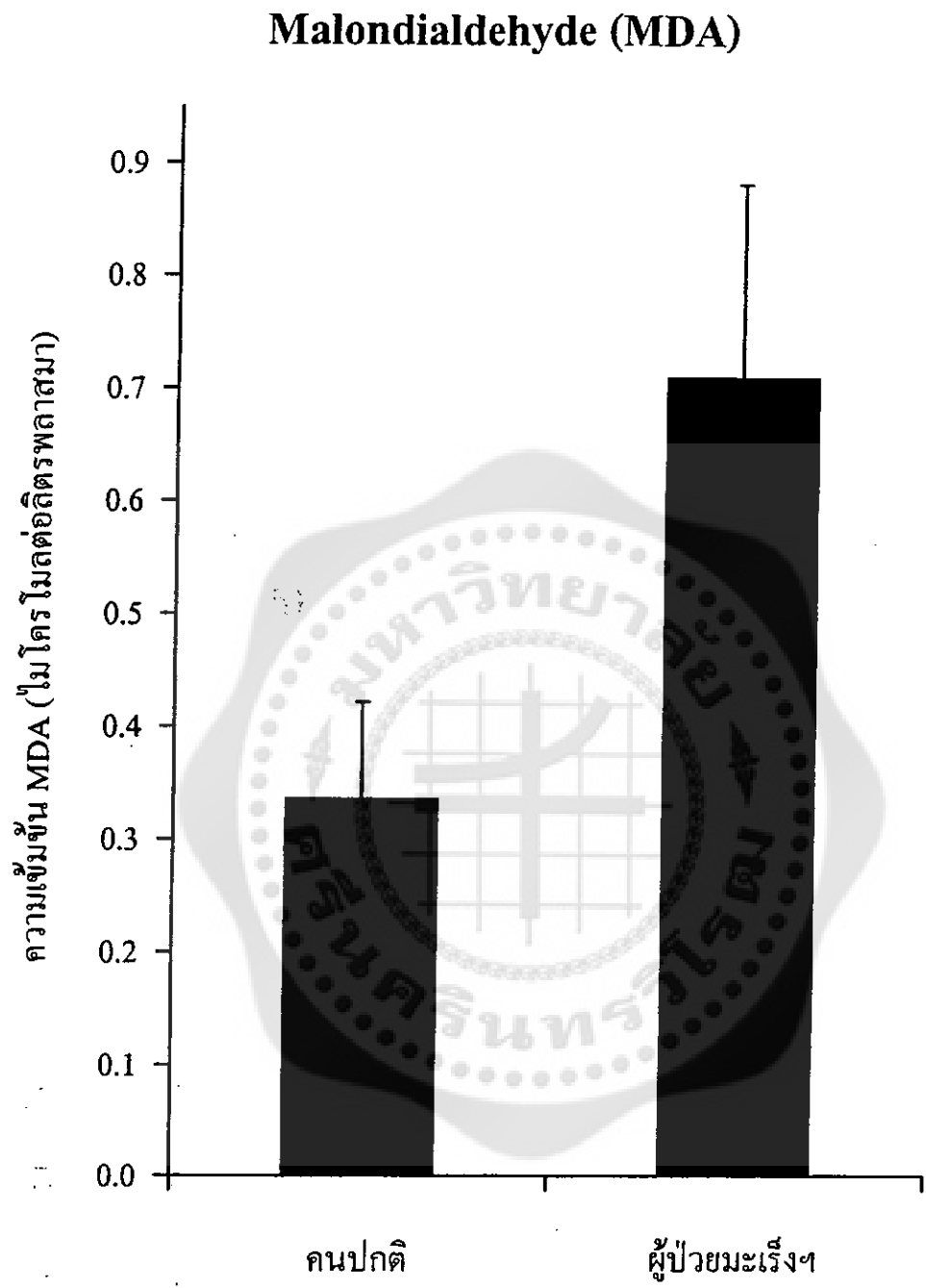
หลักการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมา อาศัยการใช้ reagent solution ที่มีสารอนุมูลอิสระเป็นส่วนประกอบ สารอนุมูลอิสระชนิดนี้มีสีฟ้าอมเขียวเข้มที่เสถียรอยู่นานหลายชั่วโมง หากพลาสมามีความสามารถใน

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระลดลงคือทำให้สีฟ้าอมเขียว นั้นจางลงเมื่อเทียบกับหลอด control ที่มีได้ใส่พลาสติกมาลงไป

ผลจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก จากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก จากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มีค่าเป็น 0.786 ± 0.075 และ 0.777 ± 0.049 มิลลิโมลต่อลิตรพลาสติก ตามลำดับ (กราฟในภาพ 14) และไม่มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.708$) ก็อาจเป็นไปได้ว่าร่างกายปรับตัวให้ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติกโดยรวมเท่า ๆ กันกับภาวะ ปกติ แต่องค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระจะต่างกัน ขึ้นกับสารอนุมูลอิสระที่ เกิดขึ้นในร่างกายว่าต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระใดไปกำจัด

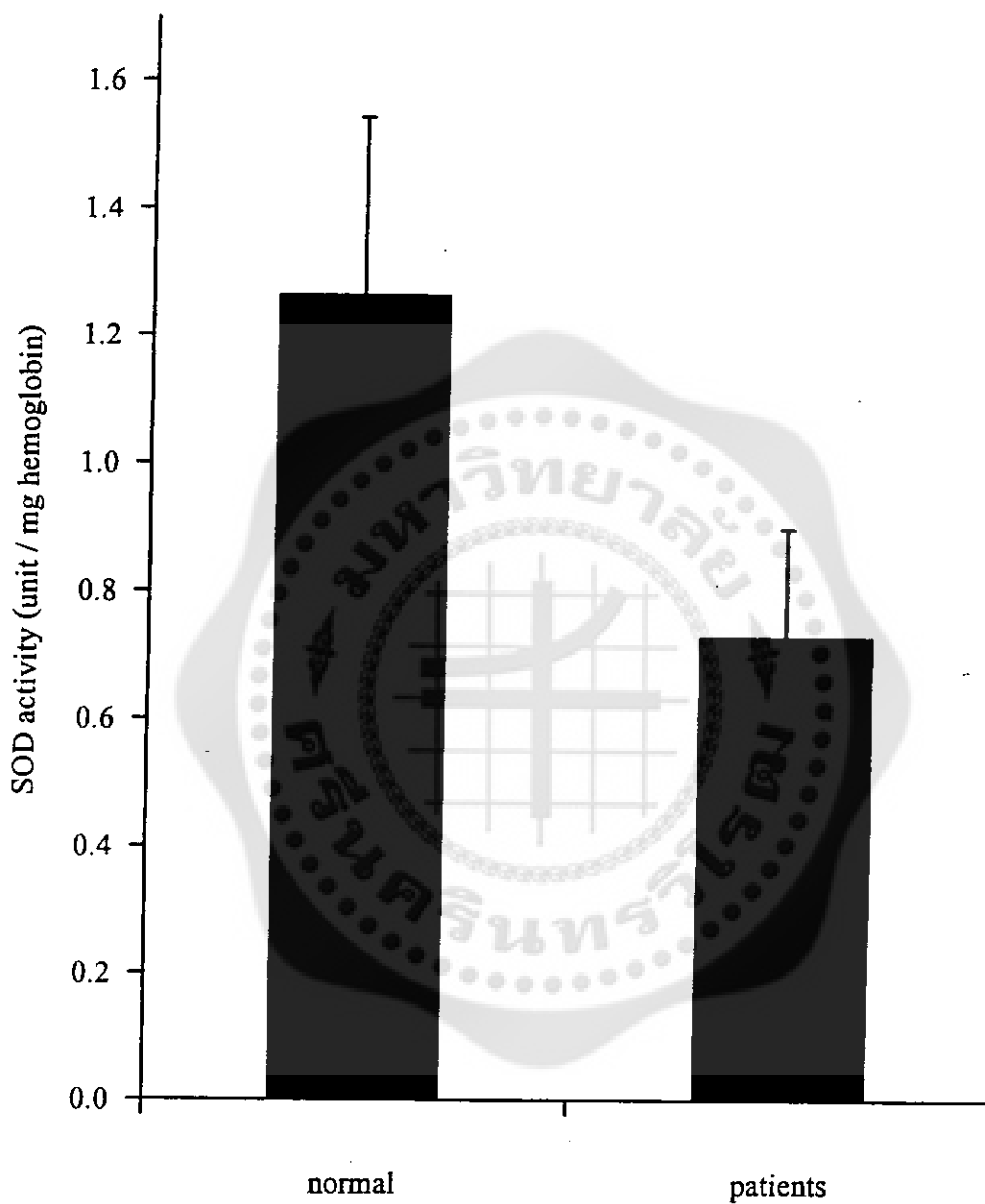
การศึกษาความเป็นกรดต่างของปัสสาวะในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

การวิจัยในส่วนนี้ศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 5 ราย ขณะปกติก่อนที่จะให้ยามัยโดมัย ซินซี ปัสสาวะของผู้ป่วยมีความเป็นกรดอยู่ระดับหนึ่ง คือ ประมาณ 5.5-6.0 หลังจาก ใส่ยามัยโดมัยซินซีในกระเพาะปัสสาวะ แล้วทำการวัด pH ของปัสสาวะที่มีผู้ป่วยถ่าย ทั้งครั้งแรกซึ่งจะมียามัยโดมัยซินซีอยู่ พบว่าความเป็นกรดต่างของปัสสาวะผู้ป่วยยังคง เดิมในช่วง 5.5-6.0 หากจะมีการเปลี่ยนแปลงบ้างก็จะอยู่ในช่วง ± 0.1 เท่านั้น ดังนั้น การศึกษาในส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่าการดื้อยามัยโดมัยซินซีของผู้ป่วยเกิดจากสาเหตุ อื่นที่มีได้มาจากฤทธิ์ของยามัยโดมัยซินซีที่ลดลง



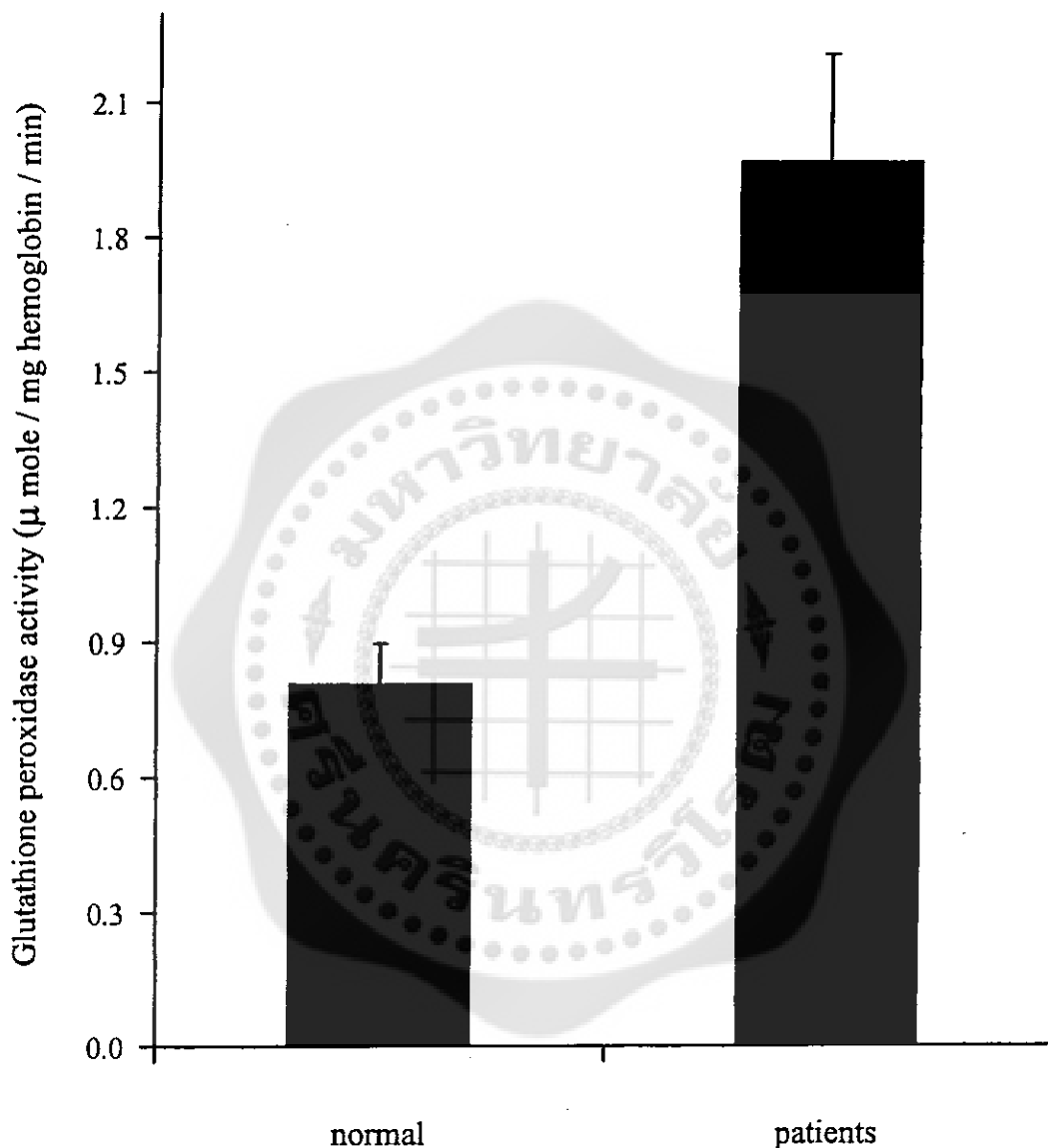
ภาพ 7. กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย (0.336 ± 0.086 , 0.157 - 0.457 ไมโครโมลต่อลิตรพลาสมา) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 16 ราย (0.709 ± 0.172 , 0.457 - 0.872 ไมโครโมลต่อลิตรพลาสมา)

Superoxide dismutase (SOD)



ภาพ 8 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ superoxide dismutase activity
 ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย
 (1.263 ± 0.280, 0.916 - 1.751 unit ต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน)
 และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย
 (0.730 ± 0.170, 0.514 - 1.209 unit ต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน)

Glutathione peroxidase (GPx)



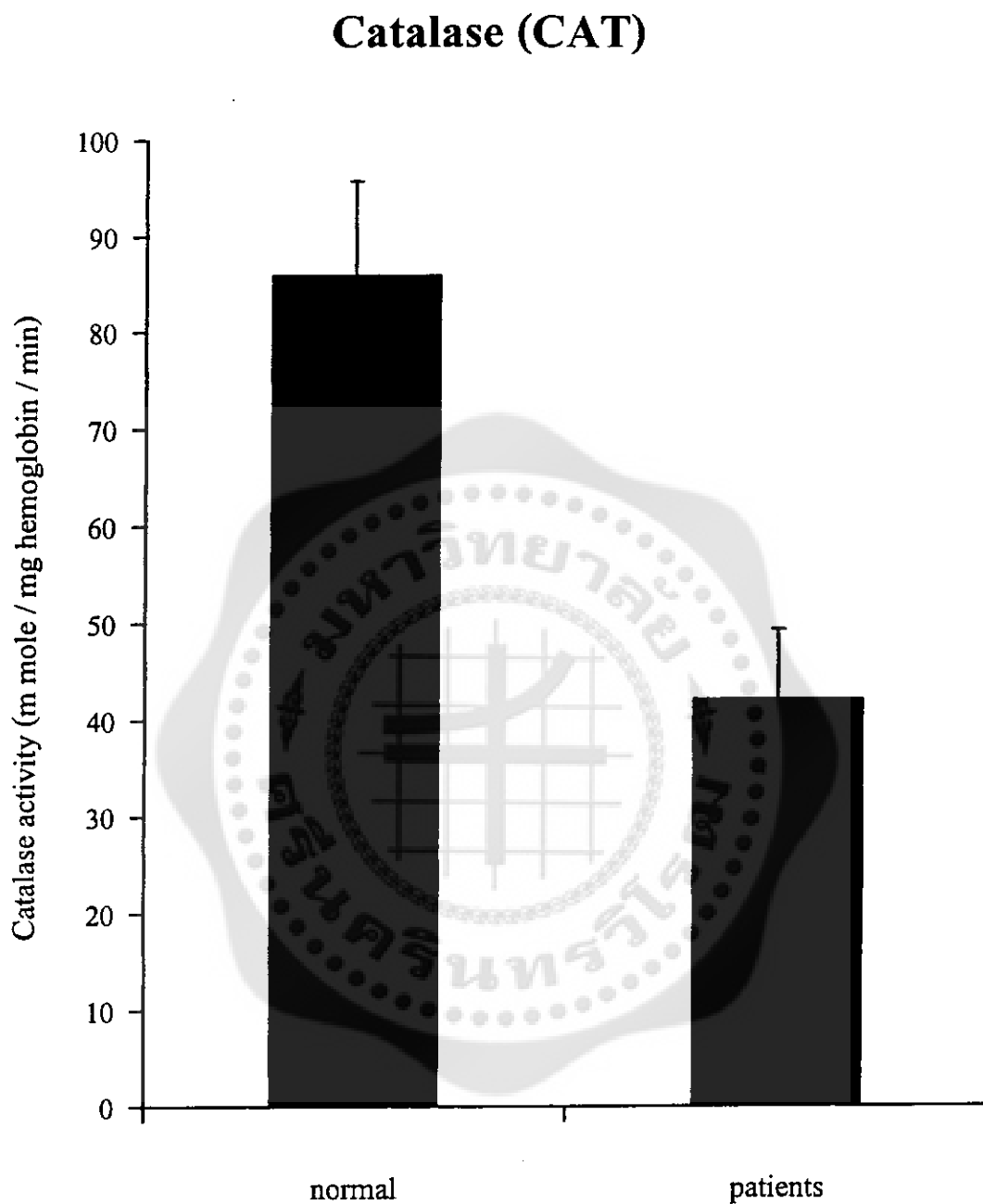
ภาพ 9 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ glutathione peroxidase activity

ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย

(0.806 ± 0.091, 0.696 - 1.041 ไมโครโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อนาที)

และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย

(1.966 ± 0.241, 1.462 - 2.457 ไมโครโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อนาที)



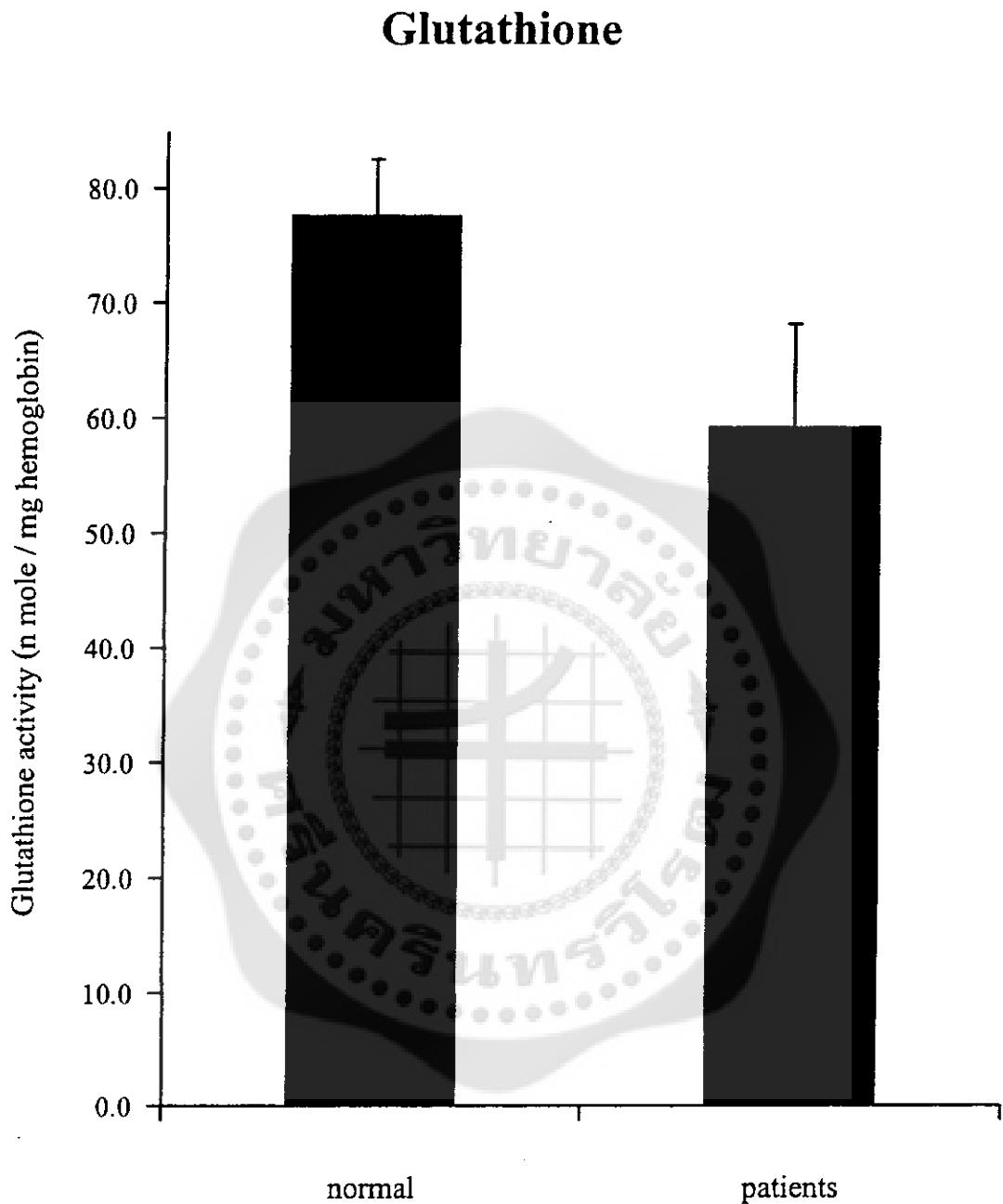
ภาพ 10 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ catalase activity

ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย

(85.953 ± 9.830, 70.541 - 98.236 มิลลิโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อนาที)

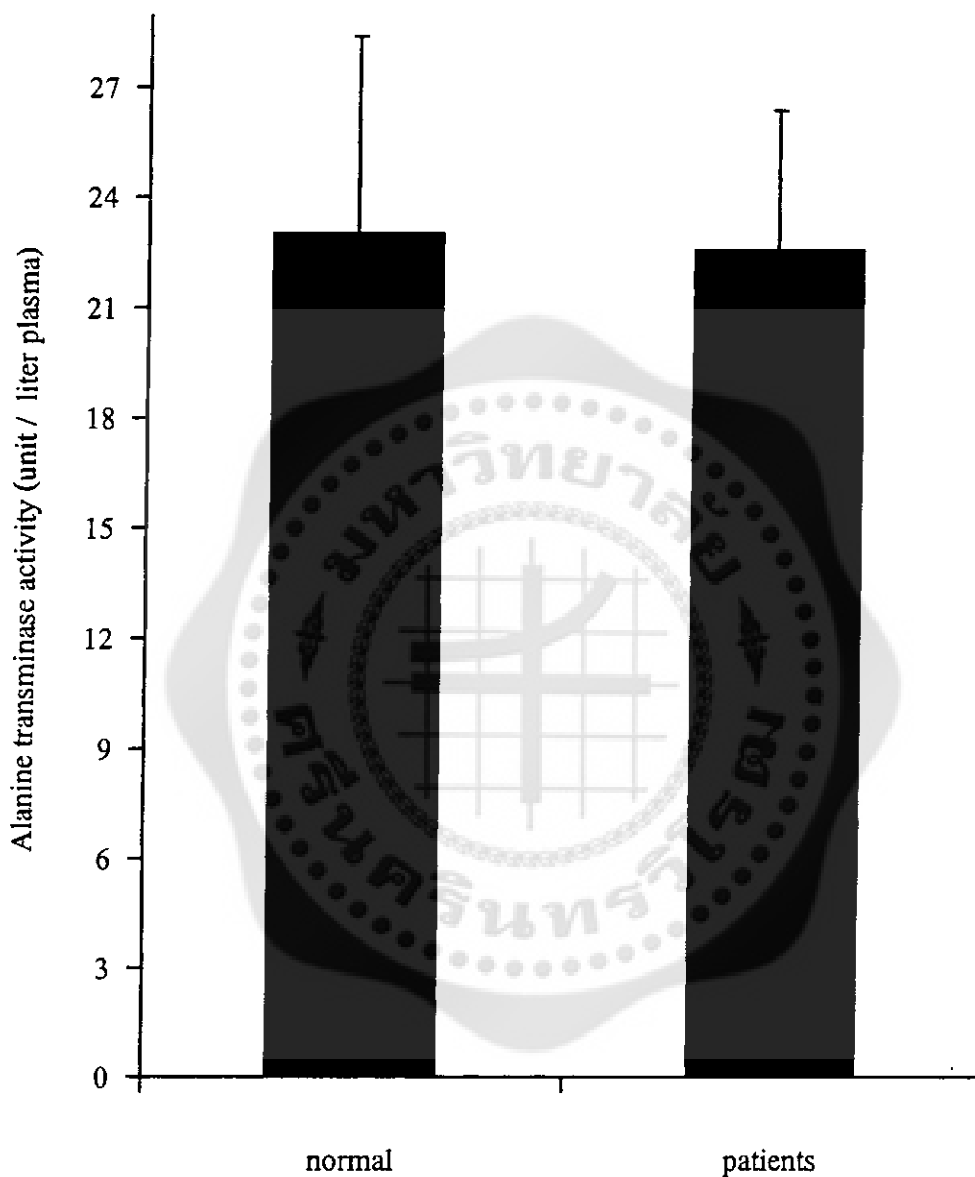
และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย

(42.177 ± 7.220, 34.351 - 54.893 มิลลิโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบินต่อนาที)

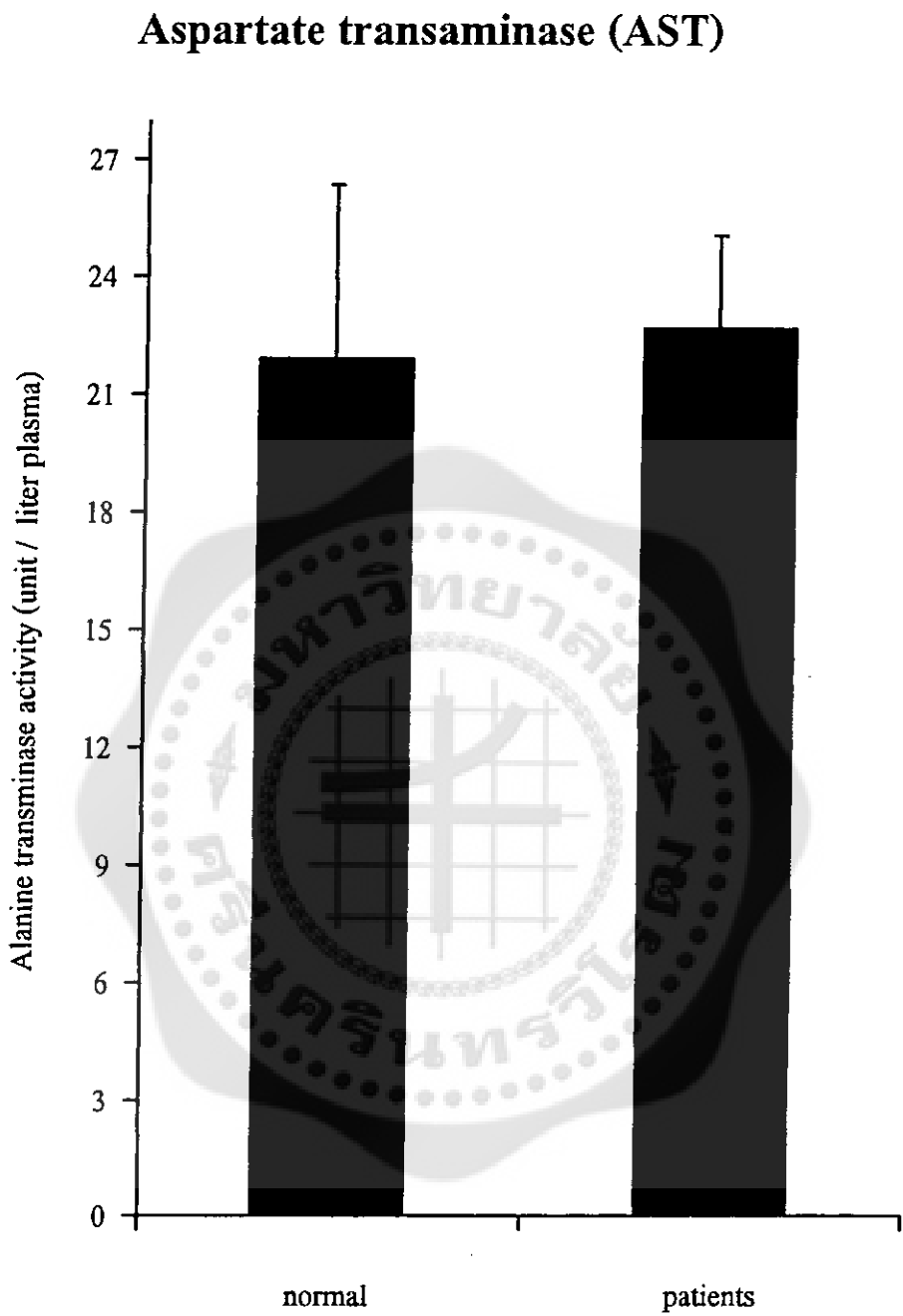


ภาพ 11 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ glutathione activity
 ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย
 (77.593 ± 5.011, 70.211 - 87.389 นาโน โมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน)
 และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย
 (59.199 ± 9.001, 49.682 - 77.926 นาโน โมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน)

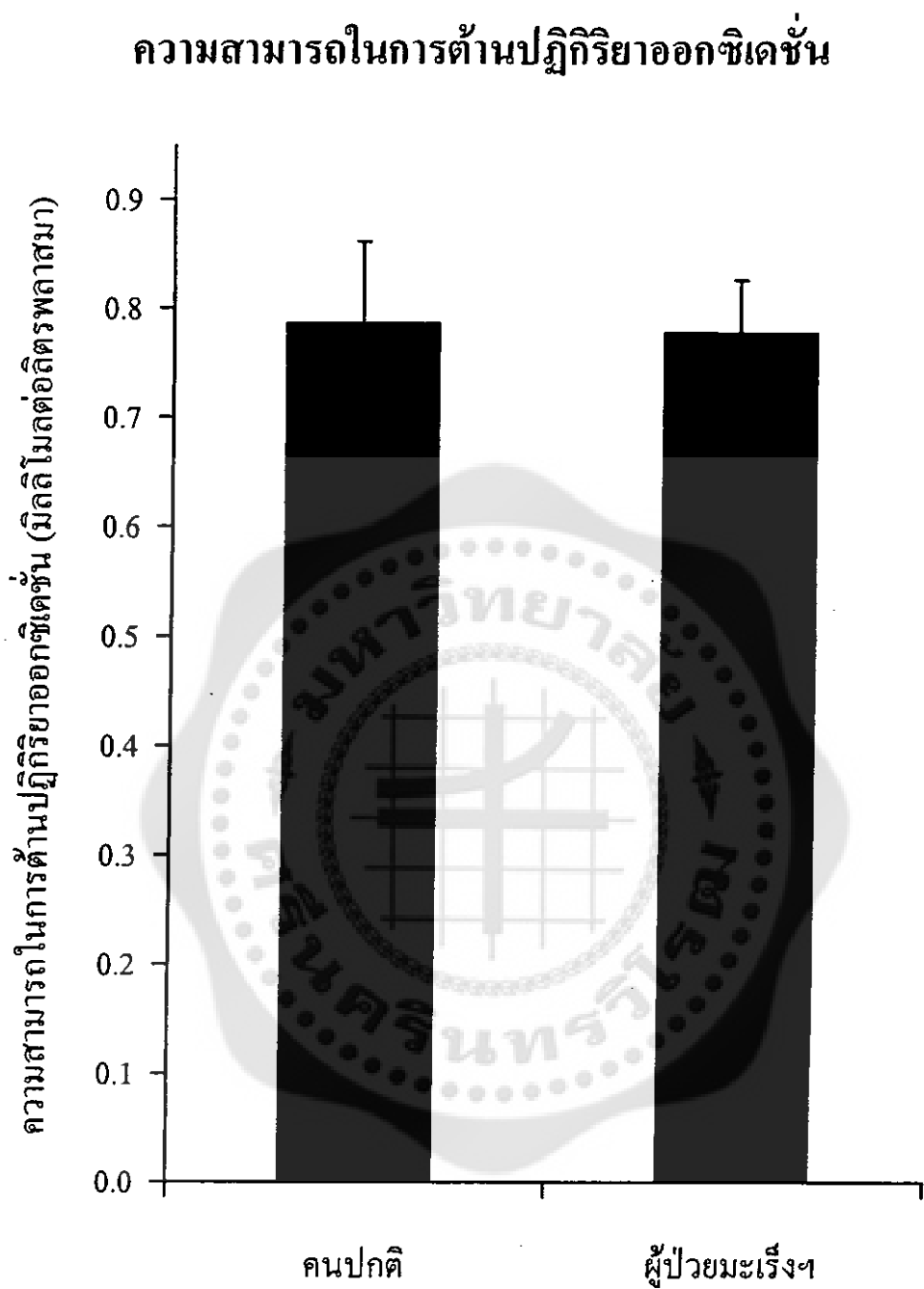
Alanine transaminase (ALT)



ภาพ 12 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ alanine transaminase activity ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย
(23.015 ± 5.400, 15.714 - 29.682 unit ต่อลิตรพลาสมา)
และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย
(22.582 ± 3.818, 17.460 - 31.428 unit ต่อลิตรพลาสมา)



ภาพ 13 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ aspartate transminase activity
ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย
(21.904 ± 4.442, 19.206 - 27.936 unit ต่อลิตรพลาสมา)
และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ จำนวน 16 ราย
(22.698 ± 3.818, 19.206 - 26.190 unit ต่อลิตรพลาสมา)



ภาพ 14 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน
ในอาสาสมัครปกติจำนวน 11 ราย
(0.786 ± 0.075, 0.599 - 0.878 มิลลิโมลต่อลิตรพลาสมา)
และผู้ป่วยเอดส์ระยะแพร่กระจาย จำนวน 16 ราย
(0.777 ± 0.049, 0.692 - 0.884 มิลลิโมลต่อลิตรพลาสมา)

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยในโครงการนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อ ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ คณะผู้วิจัยจึงขอสรุปประเด็นไว้ดังต่อไปนี้

(1) **การศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อ** ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงเป็น primary cell line ควรเป็นระยะแรก ๆ เช่น TIS และ Ta เนื่องจากชิ้นเนื้อจะอยู่ในระยะท้าย ๆ ซึ่งมีพัฒนาการของเซลล์ไม่ดี เจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการได้ช้ามาก และจะตายไปอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถนำมาทำ passage เพิ่มจำนวนให้ได้ตามต้องการ วิธีการที่น่าจะเหมาะสมมากกว่าคือ การนำชิ้นเนื้อสดมาแยกเซลล์บุผิวกระเพาะปัสสาวะปกติ เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เซลล์บุผิวหลอดเลือด เซลล์ fibroblast และอื่น ๆ ออกจากกัน แล้วจึงนำเซลล์บุผิวกระเพาะปัสสาวะและเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะไปศึกษาว่ามีสารพันธุกรรมตำแหน่งใดบนโครโมโซมใดบ้างที่ผิดปกติด้วยวิธี comparative genomic hybridization (CGH) ต่อไป

(2) **การศึกษาในตัวอย่างเลือด** ผลจากการวิจัยในส่วน of ตัวอย่างเลือดของโครงการวิจัยนี้ถือว่าสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยขอสรุปผลงานในส่วนนี้เป็น 3 ประเด็นหลักคือ

2.1 โครโมโซมของเซลล์ lymphocyte จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่คัดแยกด้วยวิธีไมโครการคัดแยกเซลล์ไม่สามารบ่งบอกการแตกหักที่ซ้ำ ๆ กันจนเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็น marker ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิดที่คัดแยกด้วยวิธีไมโครการคัดแยกเซลล์ได้

2.2 รายงานการวิจัยในอดีตมักจะรายงานการเกิดสารอนุมูลอิสระเมื่อปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งให้กับหนูทดลอง หรือศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยตรง แต่ยังไม่มีการรายงานระดับของ MDA ในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเอาได้เลย รายงานนี้จึงเป็นการยืนยันว่าสารอนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเฉพาะมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่คัดแยกด้วยวิธีไมโครการคัดแยกเซลล์ หากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ MDA ในกระแสเลือดที่สูงมากกว่าคนปกติ โดยเฉพาะ

สูงมากประมาณ 2 เท่าของคนปกติ ให้พิจารณาว่าการดื้อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีนี้ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะนั้น

ข้อคิดที่ควรตระหนักไว้อย่างหนึ่งคือ การศึกษาในผู้ป่วยอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน และ Parkinson's disease จะมีระดับ MDA ในกระแสเลือดสูงกว่าคนปกติ ไม่มากนัก แต่สำหรับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ ชนิดนี้ถือว่าสูงมากคือประมาณ 2 เท่า สิ่งที่ต้องระวังในการแปลผลครั้งนี้ก็คือจำนวนผู้ป่วยยังไม่มากพอ ควรต้องเพิ่มจำนวนผู้ป่วยให้มากกว่าอย่างน้อย 100 รายขึ้นไป จึงจะน่าเชื่อถือมากกว่านี้ และหากเป็นผู้ป่วยประมาณ 1,000 รายก็จะสามารถสรุปได้อย่างชัดเจน

2.3 การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ ทั้ง 4 ชนิด คือ SOD, GPx, catalase และ glutathione แสดงให้เห็นความแตกต่างจากคนปกติอย่างชัดเจนดังนี้คือ

- SOD ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ มีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของคนปกติ สันนิษฐานว่าร่างกายของผู้ป่วยต้องใช้ SOD ไปกำจัดสารอนุมูลอิสระประเภท superoxide anion ที่เกิดขึ้นจำนวนหนึ่งที่มากกว่าปกติ

- GPx ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ สูงเป็น 2.5 เท่าของคนปกติ สันนิษฐานว่ามีสารอนุมูลอิสระประเภท hydroperoxides เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และอาจมากกว่า superoxide anion จนทำให้ร่างกายต้องเพิ่มการสังเคราะห์ GPx จำนวนมากไปกำจัด hydroperoxides

- Catalase ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ มีค่าเพียงประมาณครึ่งหนึ่งของอาสาสมัครปกติ สันนิษฐานว่าเกิดสาร hydrogen peroxide จำนวนหนึ่งที่มากกว่าปกติ แต่อาจไม่มากเท่า hydroperoxides ร่างกายของผู้ป่วยจึงต้องใช้ catalase ไปกำจัดสารอนุมูลอิสระประเภท hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้น

- Glutathione ของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ๆ มีค่าต่ำกว่าอาสาสมัครปกติประมาณ 24 % ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ GPx activity เนื่องจาก glutathione เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการทำงานของ GPx การที่ GPx activity มีค่าสูงแสดงว่า glutathione คงจะถูกใช้ไปในกระบวนการทำงานของ GPx

- ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสมาในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ มีค่าใกล้เคียงหรือไม่แตกต่างจากอาสาสมัครปกติ อาจเป็นกระบวนการปรับตัวของร่างกายให้ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือต้านสารอนุมูลอิสระโดยรวมมีค่าปกติ แต่องค์ประกอบแต่ละตัวของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะต่างกันออกไป

สรุปภาพโดยรวมของโครงการวิจัยนี้ก็คือ ร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพยายามปรับให้ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือต้านสารอนุมูลอิสระโดยภาพรวมไม่แตกต่างจากคนปกติ แต่องค์ประกอบในการต้านสารอนุมูลอิสระของผู้ป่วยแต่ละคนจะแตกต่างจากคนปกติ คือ มี SOD, catalase และ glutathione ต่ำกว่าปกติ แต่มี GPx สูงกว่าคนปกติ สันนิษฐานในเบื้องต้นว่าร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะฯ มีสารอนุมูลอิสระประเภท hydroperoxides อยู่สูงมากเป็นลำดับหนึ่งสำหรับสารอนุมูลอิสระชนิดอื่น เช่น superoxide anion และ hydrogen peroxide น่าจะมีปริมาณมากกว่าปกติแต่ไม่มากดังเช่น hydroperoxides ทั้งนี้จะไม่สามารถบอกได้ว่าสารอนุมูลอิสระก่อให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยวิธี หรือการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีทำให้มีสารอนุมูลอิสระจำนวนมากในกระแสเลือด แต่ก็สามารถกล่าวได้ว่าสารอนุมูลอิสระน่าจะมีข้องเกี่ยวกับอย่างใดอย่างหนึ่ง อาจเป็นทางตรงหรือทางอ้อมต่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเฉพาะมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยวิธี

ข้อสรุปเบื้องต้นที่น่าสนใจอีกประเด็นหนึ่งก็คือ ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีจะมีแบบแผน (pattern) ของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ SOD, GPx, catalase และ glutathione ที่น่าสนใจดังกล่าวมาแล้ว ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระเช่นนี้อาจนำมาใช้เป็นข้อมูลทำนายแนวโน้มการดื้อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีได้ แต่พึงระวังอย่าด่วนสรุปแน่นอน 100 % ว่าต้องเป็นเช่นนี้ เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยในโครงการวิจัยยังไม่มากพอที่จะสรุปเป็นแบบแผนที่แน่นอนได้ ควรต้องทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนผู้ป่วยให้มากกว่านี้

(3) การศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะ ความเป็นกรดต่างของปัสสาวะผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีไม่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ และคงอยู่ในช่วงความเป็นกรดที่ยาต้านมะเร็งด้วยวิธีสามารถออกฤทธิ์ได้ดี แสดงว่าการดื้อยาต้านมะเร็งด้วยวิธีน่าจะมาจากสาเหตุอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างในปัสสาวะของผู้ป่วย

ข้อเสนอแนะ

หลังจากเสร็จสิ้นโครงการวิจัยนี้แล้ว คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวความคิดสำหรับการทำวิจัยในเรื่องของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ดื้อต่อยามัยโตมัยซินซีไว้ดังต่อไปนี้

(1) ผู้ป่วยในโครงการยังมีน้อยเกินไปเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของเวลาและทุนอุดหนุนการวิจัย จำนวนผู้ป่วยควรจะมากอย่างน้อยในระดับ 100 คน ขึ้นไป จึงสามารถสรุปผลที่แน่นอนได้มากกว่านี้ โครงการวิจัยนี้เป็น preliminary study ให้เห็นภาพในเบื้องต้น

(2) หากต้องการให้โครงการนี้สมบูรณ์จะต้องทำให้ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด SBC ในระยะแรกที่ไม่ดื้อต่อยามัยโตมัยซินซีด้วย แต่ต้องใช้เวลานานเนื่องจากต้องติดตามผู้ป่วยนานเพื่อให้มั่นใจว่าเป็น SBC ที่ไม่ดื้อยา เพราะผู้ป่วยหลายรายที่ดูเหมือนว่าในครั้งแรกไม่ดื้อยา แต่ต่อมาก็ดื้อยาและกลับเป็นใหม่อีก

(3) ผลรายงานการวิจัยไม่เป็นไปในทางเดียวกัน เช่น เอนไซม์ GPx ในบางรายงานกล่าวว่ามีมากในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ บางรายงานกล่าวว่าน้อยกว่าปกติ สันนิษฐานว่ามาจากสาเหตุ 2 ประการคือ จำนวนตัวอย่างไม่มากพอ และอาจเกี่ยวกับระยะ (stage) ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วย จึงทำให้การเปรียบเทียบผลการวิจัยกับรายงานในอดีตอาจไม่สอดคล้องกัน

(4) คณะผู้วิจัยขอเสนอการวิจัยต่อเนื่องในส่วนนี้อีก 2 ประเด็น คือ

4.1 การศึกษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ค่าที่เชื่อถือได้และมั่นใจมากยิ่งขึ้น อย่างน้อยควรจะ 100 รายขึ้นไป

4.2 การศึกษา gene expression ของสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นโปรตีนหรือต้องมีเอนไซม์ (ซึ่งเป็นโปรตีน) ในการสังเคราะห์ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารโปรตีนอาจเป็นการเพิ่ม-ลดของโปรตีนจริง ๆ หรือมีสารบางอย่างมากระตุ้น-ยับยั้ง protein activity หรือ gene expression มีการเพิ่มขึ้น-ลดลง ยกตัวอย่างเช่น การที่สารต้านอนุมูลอิสระอย่างหนึ่งมีระดับไม่เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติก็อาจเป็นไปได้ว่า

- สารต้านอนุมูลอิสระนั้นไม่เปลี่ยนแปลงจริง ๆ คือ เซลล์ไม่ใช่สารต้านอนุมูลอิสระนั้นในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ อาจเนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระนั้นและสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นไม่จำเพาะชนิดกัน

- สารต้านอนุมูลอิสระนั้นถูกสร้างมากขึ้น แต่ก็ถูกใช้ไปจนเหลือเท่าระดับปกติคือ เซลล์พยายามปรับให้มีระดับเท่าปกติแล้ว กรณีหากศึกษา gene expression ของเอนไซม์ที่สร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ก็จะตอบคำถามได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระนั้นถูกสร้างมากขึ้นจริงหรือไม่

- สารต้านอนุมูลอิสระนั้นถูกสร้างขึ้นมากปกติเท่าเดิม แต่มีสารบางอย่างมากระตุ้น activity ของสารต้านอนุมูลอิสระให้สูงขึ้น

การศึกษา gene expression จะตอบคำถามตรงนี้ได้ ซึ่งจะเป็นรากฐานการวิจัยระดับโมเลกุลของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วยของไทยต่อไป

ปัญหาในการทำวิจัย

ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ทุ่มเทความอุตสาหะอย่างสูงในการดำเนินการวิจัยให้สมดังเจตนารมณ์ที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้มอบความไว้วางใจให้ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะผู้วิจัยจึงขอสรุปปัญหาในการทำงานไว้เป็นประเด็นดังต่อไปนี้เพื่อเป็นพื้นฐานการทำวิจัยในเรื่องของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแก่ผู้ทำวิจัยรายอื่น ๆ ต่อไป

(1) ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเฉพาะที่คือต่อมามัยโตมัยซินซึ่งจะเจริญไปเป็น primary cell line ได้ยากมาก และมีโอกาสติดเชื้อสูง ควรใช้ยาปฏิชีวนะช่วย รายงานจากต่างประเทศเป็นการศึกษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะธรรมดาในระยะต้น ๆ และยังไม่มีการรายงานการวิจัยมะเร็งที่คือต่อมามัยโตมัยซินซึ่งเป็น primary cell line ใดเลย

(2) ผู้ป่วยที่คือต่อมามัยโตมัยซินซึ่งหาได้ยาก และคิดปัญหาในเรื่องการมาพบแพทย์เป็นระยะอย่างสม่ำเสมอ ประกอบกับยามัยโตมัยซินมีราคาแพงมาก ผู้ป่วยหลายรายไม่สามารถจ่ายค่ายาได้ และบ่อยครั้งที่ผู้ป่วยไปหาแพทย์หลายโรงพยาบาลทำให้ติดตามข้อมูลได้ลำบาก

(3) ผู้ป่วยที่ดื้อต่อยาต้านไวรัส HIV บางรายไม่สามารถนำเข้ามาในโครงการวิจัยนี้ได้ เนื่องจากเป็นโรคบางชนิดที่ทำให้มีสารอนุมูลอิสระในกระแสเลือดสูงเช่น เอชส์ เบาหวาน มะเร็งชนิดอื่น และตับอักเสบ เป็นต้น

(4) ในการวิจัยนี้มีความล่าช้ากว่ากำหนดที่คาดไว้เดิมว่า จะใช้เวลาประมาณ 1 ปี (ตุลาคม 2542 - กันยายน 2543) เนื่องจากมีการทดลองย่อย ๆ จำนวนมาก เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การศึกษาการแตกหักของโครโมโซม และการวิเคราะห์สารต่าง ๆ อีกถึง 8 protocols ทำให้ต้องเสียเวลาในการทดลอง (trial and error) และทำวิจัยในส่วนนี้ค่อนข้างมาก และผู้ป่วยก็มิได้มาพร้อมในเวลาเดียวกัน ต้องทยอยเก็บตัวอย่างไปเรื่อย ๆ ประกอบกับการได้รับอนุมัติและเริ่มต้นโครงการวิจัยในราวเดือนมีนาคม 2543 การวิจัยจึงมีความล่าช้าไปบ้าง คือ เสร็จสิ้นในเดือนมิถุนายน 2544 ใช้เวลาประมาณ 1 1/2 ปี คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขออภัยในความล่าช้ามานี้



บรรณานุกรม

1. Damjanov I. Histopathology. Williams & Wilkins, 1996.
2. Clara Milikowski C and Berman. Color Atlas of Basic Histopathology. First Edition, International Edition, Appleton & Lange, 1997
3. Rubin E and Farber JL. Pathology. JB Lippincott Company, 1988.
4. Prout GR Jr, Griffin PP, Nocks BN, DeFuria MD and Daly JJ. Intravesical therapy of low stage bladder carcinoma with mitomycin C : comparison of results in untreated and previously treated patients. J Urol 1982 ; 127 : 1096-8.
5. Issell BF, Prout GR Jr, Soloway MS, Cummings KB, Brannen G, Veenema R, Flanagan M, Block NL, Summers JL and Levin EA. Mitomycin C intravesical therapy in noninvasive bladder cancer after failure on thiotepa. Cancer 1984 ; 53 : 1025-8.
6. Soloway MS. Intravesical and systemic chemotherapy in the management of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am 1984 ; 11 : 623-35.
7. van Helsdingen PJ, Rikken CH, Sleetboom HP, de Bruyn EA and Tjaden UR. Mitomycin C resorption following repeated intravesical instillations using different instillation times. Urol Int 1988 ; 43 : 42-6.
8. Netto NR Jr and Lemos GC. A comparison of treatment methods for the prophylaxis of recurrent superficial bladder tumors. J Urol 1983 ; 129 : 33-4.
9. Lamm DL, Blumenstein BA and Crawford ED. Randomized intergroup comparison of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy and mitomycin C chemotherapy prophylaxis in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Urol Oncol 1995 ; 1 : 119.

10. Harrison GSM, Green DF, Newling DWW, Richards B, Robinson MRG and Smith PH. A phase II study of intravesical mitomycin C in the treatment of superficial bladder cancer. Br J Urol 1983 ; 55 : 1676-9.
11. Sommerville JJF, Newling DWW, Richards B, Robinson MRG and Smith PH. Mitomycin C in superficial bladder cancer : 24 week follow-up. Br J Uro 1985 ; 57 : 586-9.
12. Hetherington JW, Newling DWW, Robinson MRG, Smith PH, Adib RS and Whelan P. Intravesical mitomycin C for the treatment of recent superficial bladder tumors. Br J Urol 1987 ; 59 : 239-41.
13. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin 1998 ;48 : 6-29.
14. Genetic detection of bladder cancer by microsatellite analysis of p16, RB1 and p53 tumor suppressor genes. J Urol 2001 ; 165 : 249-52.
15. Uchida T, Wang C, Wada C, Iwamura M, Egawa S and Koshiba K. Microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. Int J Cancer 1996 ; 69 : 142-5.
16. Heney NM. Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long-term disease course. Urol Clin North Am 1992 ; 19 : 429-33.
17. Soloway MS. The management of superficial bladder cancer. Cancer 1980 ; 45(7 Suppl) : 1856-65.
18. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, Soloway MS and Block NL. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. J Urol 2000 ; 163 : 348-56.
19. Friedell GH, Parija GC, Nagy GK and Soto EA. The pathology of human bladder cancer. Cancer 1980 ; 45(7 Suppl) : 1823-31.

20. Soloway MS. Invasive bladder cancer: selection of primary treatment. *Semin Oncol* 1990 ; 17 : 551-4.
21. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD and Hawkins IR. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983 ; 130 : 1083-6.
22. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon CC. Genetic alteration in bladder cancer. *Lancet* 1993 ; 342 : 469-71.
23. Raghavan D, Shipley W, Garnick M, Russell P, Richie J. The biology and management of bladder cancer. *N Eng J Med* 1990 ; 322 : 1129-38.
24. Calabresi and Chabner BA. Chemotherapy of Neoplastic diseases. In Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. Ninth Edition, Hardman JG and Limbird LE, eds, McGraw-Hill, 1996.
25. Badalament RA and Farah RN. Treatment of superficial bladder cancer with intravesical chemotherapy. *Semin Surg Oncol* 1997 ; 13 : 335-41.
26. De Bruijn EA, Sleetboom HP, van Helsdingen PJ, van Oosterom AT, Tjaden UR and Maes RA. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C upon different dwelling times. *Int J Cancer* 1992 ; 51 : 359-64.
27. Dalton JT, Wientjes MG, Badalament RA, Drago JR and Au JL. Pharmacokinetics of intravesical mitomycin C in superficial bladder cancer patients. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5144-52.
28. Verweij and Pinedo HM. Mitomycin C : mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990 ; 1 : 5-13.
29. Torti FM and Lum BL. The biology and treatment of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol* 1984 ; 2 : 505-31.
30. Carroll PR, Williams RD, Kim MJ and Dombrovskis S. Mitomycin C reused : an in vitro costeffectiveness study. *J Urol* 1984 ; 132 : 583-6.

31. Wajsman Z, Dhafir RA, Pfeffr M, MacDonald S, Block A, Dragone N and Pontess JE. Studies of mitomycin C absorption after intravesical treatment of superficial bladder cancer tumors. J Urol 1984 ; 132 : 30-3.
32. MacFarlane JR and Tolley DA. Intravesical mitomycin C therapy for superficial bladder cancer. Report of a multicentre phase II study. Br J Urol 1985 ; 57 : 37-9.
33. Soloway MS. Treatment of superficial bladder cancer with intravesical mitomycin C : analysis of immediate and long-term response in 70 patients. J Urol 1985 ; 57 : 37-9.
34. Hamdy FC, Hastie KJ, Kerry R and Williams JL. Mitomycin C in superficial bladder cancer : Is long term maintenance therapy worthwhile ? Br J Urol 1993 ; 71 : 183-6.
35. Tolley DA, Hargreave TB, Smith PH, Williams JL, Grigor KM, Parmar MK, Freeman LS and Uscinska BM. Effect of mitomycin C on the recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer : An interim report from the Medical Research Council Subgroup on Superficial Bladder Cancer (Urological Centre Working Party). Br Med J Clin Res Ed 1988 ; 296 : 1759-61.
36. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, Lallemand G, Benyon LL, et al. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer : a further report with 7 years of follow up. J Urol 1996 ; 155 : 1233-8.
37. Bono AV, Hall RR, Denis L, Lovisolo JA and Sylvester R. Chemoresection in Ta-T1 bladder cancer. Members of the EORTC Genito-Urinary Group. Eur Urol 1996 ; 29 : 385-90.
38. Minervini R, Felipetto R, Vigano L, Pampaloni S and Fiorentini L. Recurrences and progression of superficial bladder cancer following long-term intravesical prophylactic therapy with mitomycin C : 48-month follow-up. Urol Int 1996 ; 56 : 234-7.

39. Pycha A, Mian C, Hofbauer J, Haitel A, Weiner H and Marberger M. Does topical instillation therapy influence chromosomal aberrations influence chromosomal aberrations in superficial bladder cancer ? J Urol 1998 ; 159 : 265-9.
40. Brausi M, Campo B, Pizzocaro G, Rigatti P, Parma A, Mazza G, Vicini A and Stephen RL Intravesical electromotive administration of drugs for treatment of superficial bladder cancer : a comparative phase II study. Urology 1998 ; 51 : 506-9.
41. Gao X, Au JL, Badalament RA and Wientjes MG. Bladder tissue uptake of mitomycin C during intravesical therapy is linear with drug concentration in urine. Clin Cancer Res 1998 ; 4 : 139-43.
42. Milani C, Bassi P, Meneghini A, Garbeglio A, Zattoni F, Piazza N, Maruzzi D, Brago-Ferrante GL and Pagano F. Mitomycin C in multiple superficial bladder tumors : short-term therapy, long-term results. Urol Int 1992 ; 48 : 154-6.
43. da Silva FC, Ferrito F, Brandao T and Santos A. 4'-epidoxorubicin versus mitomycin C intravesical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer. Eur Urol 1992 ; 21 : 42-4.
44. Hamdy FC, Hastie KJ, Kerry R and Williams JL. Mitomycin C in superficial bladder cancer. Is long-term maintenance therapy worthwhile after initial treatment ? Br J Urol 1993 ; 71 : 183-6.
45. Jauhiainen K and Rintala E. Superficial urinary bladder cancer. Results from the Finnbladder studies and a review on instillation treatment. Ann Chir Gynaecol Suppl 1993 ; 206 : 31-8.
46. Boccardo F, Cannata D, Rubagotti A, Guameri D, Decensi A, Canobbio L, Curotto A, Martorana G, Pegoraro C, Selvaggi F, et al. Prophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin or interferon alfa-2b: results of a multicentric Italian study (see comments). J Clin Oncol 1994 ; 12 : 7-13.

47. Schwarzman MI, Johanson KE, Surya B and Brown J. Study of intravesical mitomycin C in patients with multiple prior occurrences of superficial bladder cancer. *Urology* 1988 ; 32 : 355-8.
48. Schwarzman MI, Johanson KE, Surya B and Brown J. Study of intervesical mitomycin C in patients with multiple prior occurrences of superficial bladder cancer cell lines. *J Urol* 1993 ; 150 (2Pt1) : 505-9.
49. Basu TK, Temple NJ and Garg. *Antioxidant in Human Health and Disease*. CABI Publishing, 1999.
50. Punchard NA and Kelly FJ. *Free Radicals*. IRL press, 1996.
51. Rice-Evans CA, Diplock AT and Symons. *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier Science Publishing Company, 1991.
52. Gauchez AS, Riondel J, Fernandes-Carlos T, Jacrot M, Guiraud P, Coudray C, Calop J and Favier A. Effect of oestrone on the natural killer (NK) cell activity, antioxidant status and tumour growth in athymic mice xenografted with human tumours. *Anticancer Res* 1996 ; 16 : 853-9.
53. Patterson RE, White E, Kristal AR, Neuhouser ML and Potter JD. Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control* 1997 ; 8 : 786-802.
54. Malone WF, Kelloff GJ, Pierson H and Greenwald P. Chemoprevention of bladder cancer. *Cancer* 1987 ; 60 (3 Suppl) : 650-7.
55. Gauchez AS, Riondel J, Jacrot M, Calop and Favier A. Antioxidant status and lipid peroxidation in athymic mice xenografted with two types of human tumors. *Biol Trace Elem Res* 1995 ; 47 : 103-9.
56. Fathian-Sabet B, Bloch W, Klotz T, Niggemann S, Jacobs G, Addicks K and Engelmann U. Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the

nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. J Urol 2001 ;165 : 1724-9.

57. Tamatani T, Turk P, Weitzman S and Oyasu R. Tumorigenic conversion of a rat urothelial cell line by human polymorphonuclear leukocytes activated by lipopolysaccharide. Jpn J Cancer Res 1999 ; 90 : 829-36.
58. Miyajima A, Nakashima J, Tachibana M, Nakamura K, Hayakawa M and Murai M. N-acetylcysteine modifies cis-dichlorodiammineplatinum-induced effects in bladder cancer cells. Jpn J Cancer Res 1999 ; 90 : 565-70.
59. Maeda H. Carcinogenesis via microbial infection. Gan To Kagaku Ryoho 1998 ; 25 : 1474-85.
60. Nagai F, Ushiyama K, Satoh K, Kasai H and Kano I. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated in vitro with phenylhydroquinone, the major metabolite of O-phenylphenol. Carcinogenesis 1995 ; 16 : 837-40.
61. Clement MV and Stamenkovic I. Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. EMBO J 1996 ; 15 : 216-25.
62. Lakshmi VM, Zenser TV, Sohani S and Davis BB. Mechanism of formation of the thioether conjugate of the bladder carcinogen 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)-thiazole (ANFT). Carcinogenesis 1992 ; 13 : 2087-93.
63. Wise RW, Zenser TV and Davis BB. Prostaglandin H synthase metabolism of the urinary bladder carcinogens benzidine and ANFT. Carcinogenesis 1983 ; 4 : 285-9.
64. Kubota Y, Shuin T, Kawasaki C, Hosaka M, Kitamura H, Cai R, Sakai H, Hashimoto K and Fujishima A. Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. Br J Cancer 1994 ; 70 : 1107-11.

65. Loughlin KR, Manson K, Cragale D, Wilson L, Ball RA and Bridges KR. The use of hydrogen peroxide to enhance the efficacy of doxorubicin hydrochloride in a murine bladder tumor cell line. J Urol 2001 ; 165 : 1300-4.
66. Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Giannopoulos A, Kyriakou G and Dimopoulos C. Oxidative stress of red blood cells during Bacillus Calmette-Guerin intravesical instillations. In Vivo 2000 ; 14 : 721-4.
67. Nissenkorn I, Lavie G, Keisari Y, Leib Z, Vilcovsky E, Servadio C and Shachter H. Experience with bacillus Calmette-Guerin in patients with superficial bladder tumors. Value of monocyte activation in intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. Eur Urol 1987 ; 13 : 246-50.
68. Berendsen CL, Mulder TP and Peters WH. Plasma glutathione S-transferase pi 1-1 AND alpha 1-1 levels in patients with bladder cancer. J Urol 2000 ; 164 : 2126-8.
69. Gusev VA, Brusov OS and Panchenko LF. Superoxide dismutase—radiobiologic significance and possibilities (review). Vopr Med Khim 1980 ; 26 : 291-301.
70. Sanchiz F, Milla A, Artola N, Julia JC, Moya LM, Pedro A and Vila A. Prevention of radioinduced cystitis by orgotein: a randomized study. Anticancer Res 1996 ; 16 : 2025-8.
71. Edsmyr F and Menander-Huber KB. Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy. Eur J Rheumatol Inflamm 1981 ; 4 : 228-36.
72. Menander-Huber KB, Edsmyr F and Huber W. Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy. Scand J Urol Nephrol Suppl 1980 ; 55 : 219-24.
73. Menander-Huber KB, Edsmyr F and Huber W. Orgotein (superoxide dismutase): a drug for the amelioration of radiation-induced side effects. A double-blind, placebo-controlled study in patients with bladder tumours. Urol Res 1978 ; 6 : 255-7.

74. Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O, Akyol O and Beduk Y. Adenosine deaminase, 5'nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radic Biol Med* 1994 ;16 : 825-31.
75. Singh SV, Ahmad H and Krishan A. Expression of glutathione-related enzymes in human bladder cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1990 ; 39 : 1817-20.
76. Singh SV, Xu BH, Tkalcevic GT, Gupta V, Roberts B and Ruiz P. Glutathione-linked detoxification pathway in normal and malignant human bladder tissue. *Cancer Lett* 1994 ; 77 : 15-24.
77. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JS and Tiller DJ. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1984 ; 44 : 5086-91.
78. Dawra RK, Sharma OP, Krishna L and Vaid J. Erythrocyte glutathione and its metabolizing enzymes in bovine urinary bladder cancer. *Cancer Lett* 1989 ; 48 : 143-6.
79. Kolonel LN, Hinds MW, Nomura AM, Hankin JH and Lee J. Relationship of dietary vitamin A and ascorbic acid intake to the risk for cancers of the lung, bladder, and prostate in Hawaii. *Natl Cancer Inst Monogr* 1985 ; 69 :137-42.
80. Wu HC, Lu HF, Hung CF and Chung JG. Inhibition by vitamin C of DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumor cells. *Urol Res* 2000 ; 28 : 235-40.
81. Suzuki M, Wakabayashi K, Sone H, Kushida H, Sugiyama K, Kakizoe T, Nagao M and Sugimura T. Inhibitory effect of 2-O-octadecylascorbic acid in agglutination assay with concanavalin A ; short-term examination of rat urinary bladder carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1991 ; 82 : 386-9.
82. Mori S, Murai T, Hosono M, Yamashita H, Oohara T, Makino S, Doteuchi M and Fukushima S. F344/Shi rats bearing type b catalase-1 locus are sensitive to

- sodium L-ascorbate promotion of two-stage urinary bladder carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen* 1998 ; 18 : 27-33.
83. Kudo K and Suwa J. Inhibitory effect of vitamin E on rats with bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Hinyokika Kiyo* 1992 ; 38 : 399-404.
 84. Suhr D, Brummer F, Irmer U, Schlachter M and Hulser DF. Reduced cavitation-induced cellular damage by the antioxidative effect of vitamin E. *Ultrasonics* 1994 ; 32 : 301-7.
 85. Gohil K, Moy RK, Farzin S, Maguire JJ and Packer L. mRNA Expression Profile of a Human Cancer Cell Line in Response to Ginkgo Biloba Extract: Induction of Antioxidant Response and the Golgi System. *Free Radic Res* 2001 ; 33 : 831-49.
 86. Riggs DR, DeHaven JJ, Lamm DL. *Allium sativum* (garlic) treatment for murine transitional cell carcinoma. *Cancer* 1997 ; 79 : 1987-94.
 87. Barrington JW, Jones A, James D, Smith S and Stephenson TP. Antioxidant deficiency following clam enterocystoplasty. *Br J Urol* 1997 ; 80 : 238-42.
 88. Helzlsouer KJ, Comstock GW and Morris JS. Selenium, lycopene, alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 6144-8.
 89. Mateos S, Steel GG and McMillan TJ. Differences between a human bladder carcinoma cell line and its radiosensitive clone in the formation of radiation-induced DNA double-strand breaks in different chromatin substrates. *Mutat Res* 1998 ; 409 : 73-80.
 90. Ahn H, Lee E, Kim K and Lee C. Effect of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder carcinoma cell lines. *J Urol* 1994 ; 151 : 263-7.

91. Bedford P, Shellard SA, Walker MC, Whelan RD, Masters JR and Hill BT. Differential expression of collateral sensitivity or resistance to cisplatin in human bladder carcinoma cell lines pre-exposed in vitro to either X-irradiation or cisplatin. *Int J Cancer* 1987 ; 40 : 681-6.
92. Xu BH, Gupta V and Singh SV. Characterization of a human bladder cancer cell line selected for resistance to mitomycin C. *Int J Cancer* 1994 ; 58 : 686-92.
93. Groos E, Walker L and Masters JRW. Intravesical chemotherapy: Studies on the relationship between pH and cytotoxicity. *Cancer* 1986 ; 50 : 1199-1203.
94. Kennedy KA, McGurl JD, Leondaridis L and Alabaster O. pH dependence of mitomycin C-induced cross-linking activity in EMT6 tumour cells. *Cancer Res* 1986 ; 45 : 3541-7.
95. Siegel D, Gibson NW, Preusch PC and Ross D. Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase : Role in mitomycin C induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 7483-9.
96. Watts PL, Plumb JA, Courtney JM and Scott R. Sensitivity of cell lines to mitomycin C. *Br J Urol* 1996 ; 77 : 363-6.
97. Cooper AJ, Hayes MC, Duffy PM, Davies CL and Smart CJ. Multidrug resistance evaluation by confocal microscopy in primary urothelial cancer explant colonies. *Cytotechnology* 1996 ; 19 : 181-6.
98. Gan Y, Wientjes G, Badalament RA and Au JLS. Pharmacodynamics of doxorubicin in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 1996 ; 2 : 1275-83.
99. Verma RS and Babu A. Human Chromosome ; Principles and Techniques. Second Edition, McGrawHill, 1995.
100. วสันต์ จันทราพิศย์, ปราณี ลิ้นะชัย และ วาสนา ศิริรังษี. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน, 2539.

101. Kampmann T, Schmidt A, Rudiger HW, Tan TL and Passarge E. No difference in expression of chromosomal fragile sites in patients with solid malignant tumours and normal controls. *Genes Chrom Cancer* 1990 ; 2 :44-7.
102. Ohgawa H, Ohishi N and Yaki K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem* 1979 ; 95 : 351-8.
103. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975 ; 85: 337-41.
104. Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In : *Method in enzymology*, Vol II. Edited by Sidney F, Lester P. New York : Academic Press, 1978 : 506.
105. Splittgerber AG and Tappel AL. Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. *Arch Biochem Biophys* 1979 ; 197 : 534-42.
106. Paglia D and, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1976 ; 70 : 158.
107. Luck H. Catalase. *Method for Enzymatic Analysis*, Vol. 3. Edited by Han-Ulrich Bergmeyer. New York and London : Academic Press, 1965: 885-88.
108. Lew H and Quintanilha A. Effect of endurance training and exercise on tissue autoxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991 ; 16 : 59-68.
109. Boyland E and Chasseaud LF. The effect of some carbonyl compounds on rat liver glutathione levels. *Biochem Pharmacol* 1970 ; 19 : 1526-8.
110. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959 ; 82 : 70-7.
111. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. *Clinical Principles and Technics*, New York, Harper and Row, 1974 ; 881.

112. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia, WB Saunders Company, 1986 ; 676, 1815.
113. Young DS, Pestaner LC and Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975 ; 21 : 257D-261D.
114. Ziegenhorn J, Senn M and Bucher I. Molar absorptivities of b-NADH and b-NADPH. Clin Chem 1976 ; 22 : 151-60.
115. McCombs RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RD and Bower GN Jr. Determination of the molar absorptivity of NADH. Clin Chem 1976 ; 22 : 141-50.
116. Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan, LaVoie EJ and Ho CT. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). J Nat Med Prod 1999 ; 62 : 454-6.
117. Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blelloch RH, Puthenveetil JA and Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. Semin Oncol 1996 ; 23 : 571-84.
118. Cordon-Cardo C, Sheinfeld J and Dalbagni G. Genetic studies and molecular markers of bladder cancer. Semin Surg Oncol 1997 ; 13 : 319-27.
119. Spruck CH 3rd, Rideout WM 3rd, Olumi AF, Ohnseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Hermann GG, Steven K, et al. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. Cancer Res 1993 ; 53 : 1162-6.
120. Aboagye-Mathiesen G, Ebbesen P, von der Maase H and Celis JE. Interferon gamma regulates a unique set of proteins in fresh human bladder transitional cell carcinomas. Electrophoresis 1999 ; 20 : 344-8.

121. Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F and Heim S. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000 ; 29 : 256-65.
122. Kakizaki H, Yamaguchi T, Suzuki H, Kubota Y, Ishii N, Numasawa K and Suzuki K. Tumor factors concerned with primary culture of transitional cell carcinomas. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1990 ; 81 : 204-9.
123. Chuang CK and Liao SK. Human bladder carcinoma cells with an unusual pattern of in vitro growth : transition from nonproliferative spheroids to active monolayer growth upon interaction with tumor-derived fibroblasts. *Anticancer Res* 2000 ; 20 : 749-60.
124. Celis A, Rasmussen HH, Celis P, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Hein B, Ostergaard M, Wolf H, Orntoft T and Celis JE. Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis* 1999 ; 20 : 355-61.
125. Cooper AJ, Hayes MC, Duffy PM, Davies CL and Smart CJ. Multidrug resistance evaluation by confocal microscopy in primary urothelial cancer explant colonies. *Cytotechnology* 1996 ; 19 : 181-6.
126. Raghavan D, Russell PJ and Brown JL. Experimental models of histogenesis and tumor cell heterogeneity in bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 1992 ; 8 : 279-84.
127. Curran RC. *Color Atlas of Histopathology*. Third edition, Harvey Miller Publisher, Oxford University Press, 1985.
128. Hoffee PA. *Medical Molecular Genetics*. First edition, Fence Creek Publishing, 1998
129. Jorde LB, Carey JC and White RL. *Medical Genetics*. Mosby, 1994

130. King RC and Stansfield WD. A Dictionary of Genetics. Fourth Edition, Oxford University Press, 1990.
131. Atkin NB and Baker MC. Chromosome 7q deletions : observations on 13 malignant tumors. Cancer Genet Cytogenet 1993 ; 67 : 123-5.
132. Sauter G, Moch H, Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC and Mihatsch MJ. Genomic changes in urinary bladder cancer. Verh Dtsch Ges Pathol 1997 ; 81 : 287-96.
133. Fadl-Elmula I, Kytola S, Pan Y, Lui WO, Derienzo G, Forsberg L, Mandahl N, Goruova L, Bergerheim US, Heim S and Larsson C. Characterization of chromo-somal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyo-typing and FISH analysis. Int J Cancer 2001 ; 92 : 824-31.
134. Padilla-Nash HM, Nash WG, Padilla GM, Roberson KM, Robertson CN, Macville M, Schrock E and Ried T. Molecular cytogenetic analysis of the bladder carcinoma cell line BK-10 by spectral karyotyping. Genes Chromosomes Cancer 1999 ; 25 : 53-9.
135. Roberson KM, Yancey DR, Padilla-Nash H, Edwards DW, Nash W, Jacobs S, Padilla GM, Larchian WA, Robertson CN. Isolation and characterization of a novel human bladder cancer cell line: BK10. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1998 ; 34 : 537-44.
136. Smeets W, Pauwels R, Laarakkers L, Debruyne F and Geraedts J. Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. Cancer Genet Cytogenet 1987 ; 29 : 29-41.
137. Kajanachumpol A, Komindr S and Mahaisiriyodom A. Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. J Med Assoc Thailand. 1997 ; 80 : 372-7.
138. Pinweha S. Study of oxidative stress in blood of patients with Parkinson's disease. Master thesis Faculty of Graduate Studies, Mahidol University 1999.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน

การวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบิน (Sigma) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การทำ standard และ unknown sample ดังต่อไปนี้

STANDARD ละลายสารฮีโมโกลบินมาตรฐาน (standard hemoglobin) ลงใน Drabkin's solution ให้มีความเข้มข้น 6, 12 และ 18 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายมาตรฐานทั้งสี่ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ Drabkin's solution เป็น blank

SAMPLE ผสมตัวอย่างเลือด 20 ไมโครลิตรลงใน Drabkin's solution 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ Drabkin's solution เป็น blank

การคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานจะนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve หรือ calibration curve) กราฟมาตรฐานที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดศูนย์ หาค่า slope และ intercept ของกราฟมาตรฐานนี้ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณร่วมกับค่า slope และ intercept เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในแต่ละตัวอย่างในหน่วยกรัมต่อเดซิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde (MDA)

การวิเคราะห์หาปริมาณ MDA แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ การทำ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

BLANK นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile-distilled water) 200 ไมโครลิตร มาเติม 8.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 % acetic acid, 0.8 % thiobarbituric acid (TBA) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 0.2, 1.5, 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 90 °ซ. เป็นเวลานาน 60 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และสารผสม (mixture) ของ n butanol : pyridine (15 : 1 v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำชั้นของสารอินทรีย์ (organic layer) มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรเทียบกับ

สารผสมของ n butanol : pyridine ค่าการดูดกลืนแสงของ blank จะต่ำมาก แต่ต้องทำทุกครั้งเพื่อให้มั่นใจว่าสารต่าง ๆ ที่ใช้วิเคราะห์ MDA ไม่มีการปนเปื้อนของ MDA อย่างแน่นอน

STANDARD นำสารมาตรฐานคือ MDA ที่ความเข้มข้น 6, 12, 18, 24 และ 30 ไมโครโมลาร์ จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเติม 8.1 % SDS, 20 % acetic acid, 0.8 % TBA และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 0.2, 1.5, 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 90 °ซ. เป็นเวลานาน 60 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และสารผสมของ n butanol : pyridine (15 : 1 v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำชั้นของสารอินทรีย์ (organic layer) มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารผสมของ n butanol : pyridine เป็น blank

SAMPLE นำพลาสมาจำนวน 200 ไมโครลิตร มาเติม 8.1 % SDS, 20 % acetic acid, 0.8 % TBA และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 0.2, 1.5, 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 90 °ซ. เป็นเวลานาน 60 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และสารผสมของ n butanol : pyridine (15 : 1 v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำชั้นของสารอินทรีย์ (organic layer) มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรเทียบกับสารผสมของ n butanol : pyridine นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปคำนวณหาความเข้มข้นของ MDA ได้จากกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานจะนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve หรือ calibration curve) กราฟมาตรฐานที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดศูนย์ หาค่า slope และ intercept ของกราฟมาตรฐานนี้ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณร่วมกับค่า slope และ intercept เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ MDA ในแต่ละตัวอย่างในหน่วยไมโครโมลต่อลิตรพลาสมา

การวิเคราะห์ปริมาณ superoxide dismutase (SOD)

นำ hemolysate จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เย็นจัด 3.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เติม ethanol 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เติม chloroform 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที ปั่นแยกชั้นด้วยความ

แรง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 10 นาที แล้วนำชั้นสารอินทรีย์ที่อยู่ด้านบนไปวิเคราะห์ต่อ โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วนคือ blank และ sample ดังต่อไปนี้

BLANK ผสม 0.1 โมลาร์ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium cyanide (1.5 มิลลิกรัม %), 1.5 มิลลิโมลาร์ nitroblue tetrazolium (NBT), 0.12 มิลลิโมลาร์ riboflavin และ 1/15 โมลาร์ phosphate buffer จำนวน 0.2, 0.2, 0.1, 0.05 และ 2.45 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปใส่ในกล่องแสงเป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรเทียบกับ 1/15 โมลาร์ phosphate buffer

SAMPLE นำชั้นของสารอินทรีย์จำนวน 10, 20, 40, 60, 80, 200, 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 โมลาร์ EDTA, potassium cyanide (1.5 มิลลิกรัม %), 1.5 มิลลิโมลาร์ NBT, 0.12 มิลลิโมลาร์ riboflavin จำนวน 0.2, 0.2, 0.1 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตรด้วย 1/15 โมลาร์ phosphate buffer ต่อจากนั้นจึงนำไปใส่ในกล่องแสงเป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรเทียบกับ 1/15 โมลาร์ phosphate buffer

การคำนวณ นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละสารตัวอย่างมาคำนวณค่าเป็น % inhibition ตามสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{ABS}_{\text{control}} - \text{ABS}_{\text{unknown}}}{\text{ABS}_{\text{control}}} \times 100$$

แล้วเขียนกราฟระหว่าง % inhibition (แกนตั้ง) และปริมาตรของชั้นสารอินทรีย์ที่นำมาใช้ (SOD extract) ในแกนนอน โดยให้ค่า % inhibition ที่ปริมาตรสูง ๆ คือ 500 ไมโครลิตร มีค่าเป็น 100 % inhibition แล้วคำนวณค่าปริมาตรของ SOD extract ที่มีฤทธิ์ 50 % inhibition ของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน โดยนำมาคำนวณเป็นค่า SOD activity ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{SOD activity ที่ 50 \% inhibition} &= \frac{100,000}{\text{microliter ของ SOD extract} \times \text{mg hemoglobin}} \\ &= \text{unit / mg hemoglobin} \end{aligned}$$

การวิเคราะห์ปริมาณ glutathione peroxidase (GPx)

การวิเคราะห์หาปริมาณ GPx แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การทำ blank และ unknown sample โดยเตรียม reaction mixture ก่อนด้วยการละลาย glutathione, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH), glutathione reductase ลงใน Tris buffer ให้มีความเข้มข้น 0.25, 12 มิลลิโมลาร์ และ 1 unit ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

BLANK ผสม reaction mixture 1.55 มิลลิลิตร และ hemolysate 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

SAMPLE ผสม reaction mixture 1.55 มิลลิลิตร และสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม cumene hydroperoxide จำนวน 50 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เทียบกับ blank โดยอ่านเป็นค่า Δ ที่เวลา 0 และ 1 นาที

การคำนวณ นำค่า Δ ที่เวลา 0 และ 1 นาทีมาคำนวณ specific glutathione peroxidase activity ดังนี้

specific glutathione peroxidase activity

$$= \frac{\Delta \text{ abs (1 min)} \times \text{total reaction volume (TV, ml)} \times \text{dilution factor} \times 1000}{6.22 \times \text{enzyme volume (EV, ml)} \times \text{mg hemoglobin (Hb)}}$$

$$= \text{n mole / mg hemoglobin / min}$$

หากค่า activity ที่ได้สูงมากอาจเปลี่ยนมาแสดง GPx activity เป็นหน่วย micromole / mg hemoglobin / min ก็ได้

การวิเคราะห์ปริมาณ catalase (CAT)

การวิเคราะห์หาปริมาณ catalase แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การทำ blank และ sample ดังต่อไปนี้

BLANK ผสม phosphate buffer 1/15 โมลาร์ จำนวน 3 มิลลิลิตร กับสารตัวอย่างประมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร

SAMPLE ผสม H_2O_2 -phosphate buffer (30 % W/V) จำนวน 3 มิลลิลิตร กับ สารตัวอย่างประมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร เทียบกับ blank ที่เวลา 1 นาที

การคำนวณ นำค่า Δ ที่เวลา 1 นาทีมาคำนวณ catalase activity ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{catalase activity} &= \frac{\Delta \text{ abs (1 min)} \times \text{total reaction volume (TV, ml)} \times \text{dilution factor}}{0.071 \times \text{enzyme volume (EV, ml)} \times \text{mg hemoglobin (Hb)}} \\ &= \mu \text{mole / mg hemoglobin / min} \end{aligned}$$

หากค่า activity ที่ได้สูงมากอาจเปลี่ยนมาแสดง catalase activity เป็นหน่วย millimole / mg hemoglobin / min ก็ได้

การวิเคราะห์ปริมาณ glutathione

การวิเคราะห์หาปริมาณ glutathione แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ การทำ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

BLANK ผสม phosphate buffer 0.1 โมลาร์, น้ำกลั่น และ dithionitrobenzoic acid (DTNB) 0.1 โมลาร์ อย่างละ 1.5, 1.5 มิลลิลิตร และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

STANDARD นำสารมาตรฐานคือ reduced glutathione (reduced GSH) มาละลายใน phosphate buffer 0.1 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้น 10, 15, 20 25 และ 30 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร นำสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 200 ไมโครลิตร มาเติม phosphate buffer 0.1 โมลาร์, น้ำกลั่น และ DTNB 0.1 โมลาร์ อย่างละ 1.48, 1.5 มิลลิลิตร และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เทียบกับ blank

SAMPLE นำสารตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร มาเติม phosphate buffer 0.1 โมลาร์, น้ำกลั่น และ DTNB 0.1 โมลาร์ อย่างละ 1.4, 1.5 มิลลิลิตร และ 25

ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เทียบกับ blank

การคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานจะนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve หรือ calibration curve) กราฟมาตรฐานที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดศูนย์ หาค่า slope และ intercept ของกราฟมาตรฐานนี้ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาคำนวณร่วมกับค่า slope และ intercept เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ GSH ในแต่ละตัวอย่าง มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อลิตร แล้วนำไปคำนวณต่อเป็นนาโนโมลต่อ 1 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน

การวิเคราะห์ปริมาณ alanine aminotransferase (ALT)

การเตรียม reagent solution เติมน้ำกลั่น 14 มิลลิลิตร ลงใน reagent powder 1 ขวด ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำไปใช้

การวิเคราะห์ ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร แล้ว set autozero โดยใช้น้ำกลั่นทั้งใน reference compartment และ sample compartment ต่อจากนั้นผสม reagent solution 1,000 ไมโครลิตรกับพลาสมา 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 60 วินาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรเทียบกับน้ำกลั่น โดยใช้ quartz cuvette แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เสถียรเป็นเวลา 15 วินาที บันทึกเป็นค่า A_{15} และวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งหนึ่งเป็นเวลาผ่านไป 60 วินาที บันทึกเป็นค่า A_{75} ค่าการดูดกลืนแสง A_{75} จะต่ำกว่า A_{15} หาค่า ΔA จาก $A_{15} - A_{75}$ แล้วนำมาเข้าสู่สูตรคำนวณเป็นหน่วย international unit (IU) ต่อลิตรพลาสมา IU หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ ALT ที่เร่งการเปลี่ยน substrate 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะมาตรฐานที่กำหนดให้ หรืออาจเขียนสั้น ๆ เป็น unit ต่อลิตร (U/L) ดังต่อไปนี้

alanine transaminase activity (IU/L)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\Delta A / \text{min} \times 10^6 (\text{micromole}) \times \text{total reaction volume (ml)}}{\text{molar absorptivity of NADH ที่ 340 nm} \times \text{sample volume (ml)}} \\
 &= \frac{\Delta A / \text{min} \times 10^6 (\text{micromole}) \times 1.1}{6.3 \times 10^3 (\text{L mole}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 0.10} \\
 &= \Delta A / \text{min} \times 1746
 \end{aligned}$$

การวิเคราะห์ปริมาณ aspartate aminotransferase (AST)

การเตรียม reagent solution เติมน้ำกลั่น 14 มิลลิลิตร ลงใน reagent powder 1 ขวด ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำไปใช้

การวิเคราะห์ ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร แล้ว set autozero โดยใช้ น้ำกลั่นทั้งใน reference compartment และ sample compartment ต่อจากนั้นผสม reagent solution 1,000 ไมโครลิตรกับพลาสมา 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 60 วินาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรเทียบกับน้ำกลั่น โดยใช้ quartz cuvette แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เสถียรเป็นเวลา 15 วินาที บันทึกเป็นค่า A_{15} และ วัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งหนึ่งเป็นเวลาผ่านไป 60 วินาที บันทึกเป็นค่า A_{75} ค่าการดูดกลืนแสง A_{75} จะต่ำกว่า A_{15} หาค่า ΔA จาก $A_{15} - A_{75}$ แล้วนำมาเข้าสู่สูตรคำนวณ เป็นหน่วย international unit (IU) ต่อลิตรพลาสมา IU หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ AST ที่เร่งการเปลี่ยน substrate 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะมาตรฐานที่กำหนด ให้ หรืออาจเขียนสั้น ๆ เป็น unit ต่อลิตร (U/L) ดังต่อไปนี้

aspartate transaminase activity (IU/L)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\Delta A / \text{min} \times 10^6 (\text{micromole}) \times \text{total reaction volume (ml)}}{\text{molar absorbtivity of NADH ที่ 340 nm} \times \text{sample volume (ml)}} \\
 &= \frac{\Delta A / \text{min} \times 10^6 (\text{micromole}) \times 1.1}{6.3 \times 10^3 (\text{L mole}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 0.10} \\
 &= \Delta A / \text{min} \times 1746
 \end{aligned}$$

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อดูว่าพลาสมาสามารถออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเคมีในหลอดทดลองได้ดีมากน้อยเพียงใด โดยมีขั้นตอนการเตรียมและเปรียบเทียบ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

BLANK เตรียม ethylbenzylthiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลาร์ต่อลิตรใน phosphate buffer saline, peroxidase 10 ไมโครโมลาร์ และน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A_1 จากนั้นเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A_2 คำนวณค่า $A_2 - A_1$ เรียกว่าค่า Δ blank

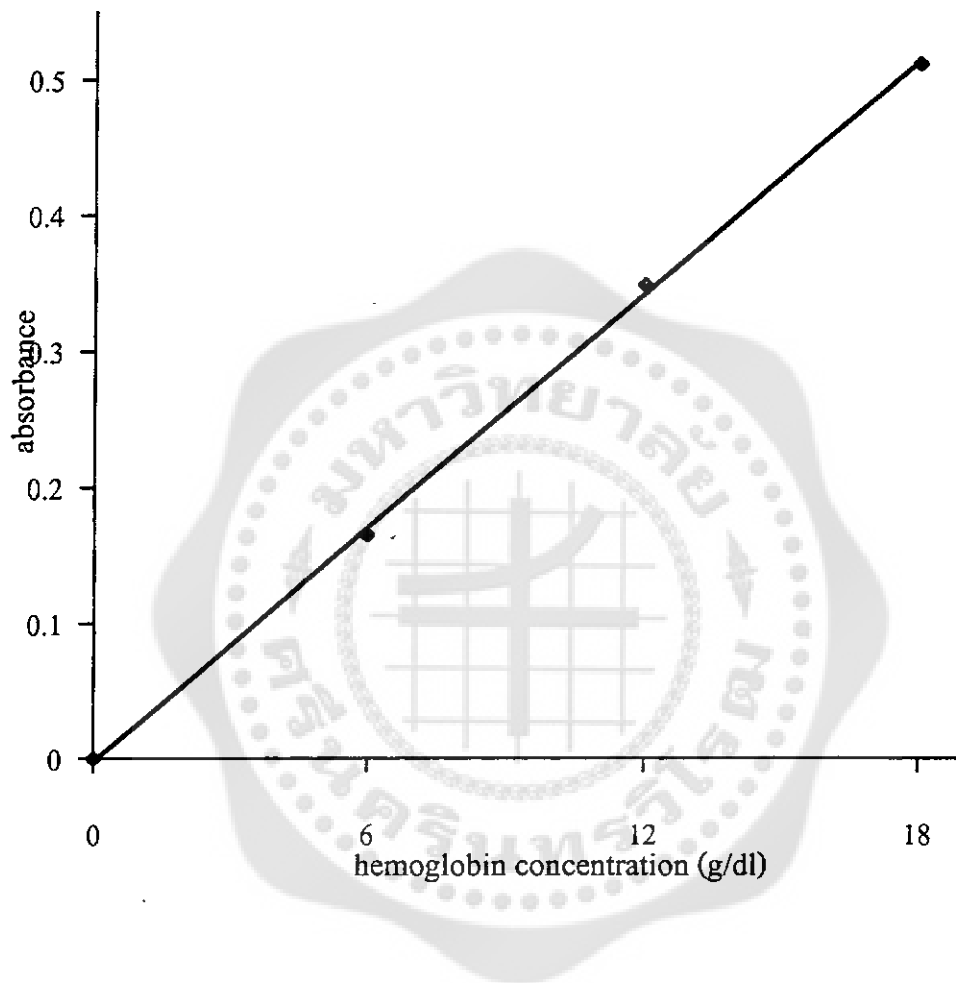
STANDARD เตรียม tetramethylchroman carboxylic acid 200 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร, ethylbenzylthiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลาร์ใน phosphate buffer saline และ peroxidase 10 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A_1 จากนั้นเติม hydrogen per-oxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A_2 คำนวณค่า $A_2 - A_1$ เรียกว่าค่า Δ standard

SAMPLE เตรียม ethylbenzylthiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลาร์ต่อลิตรใน phosphate buffer saline, peroxidase 10 ไมโครโมลาร์ และพลาสมา 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A_1 จากนั้นเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A_2 คำนวณค่า $A_2 - A_1$ เรียกว่าค่า Δ sample

การคำนวณ นำค่า Δ blank, Δ standard และ Δ sample มาคำนวณหาค่า antioxidant activity ได้ดังนี้

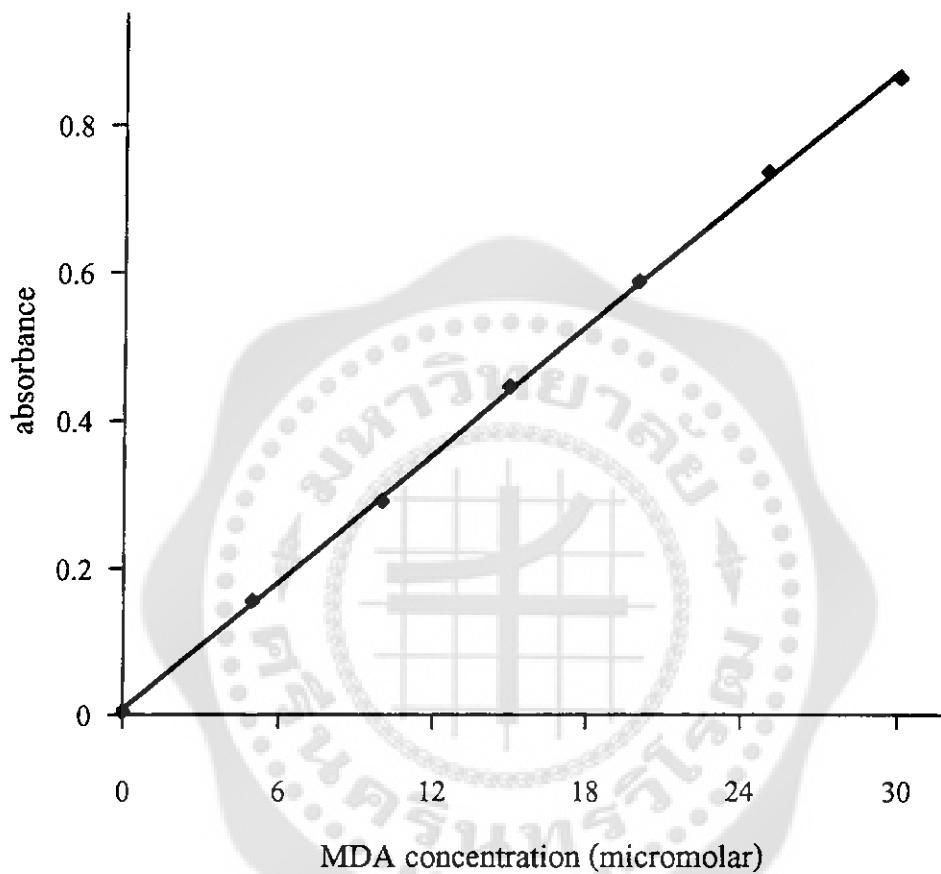
$$\begin{aligned} \text{factor} &= \frac{\text{conc of tetramethylchroman carboxylic acid}}{(\Delta \text{ blank} - \Delta \text{ standard})} \\ \text{antioxidant activity} &= \text{factor} \times (\Delta \text{ blank} - \Delta \text{ sample}) \\ &= \text{มิลลิโมลต่อลิตรพลาสมา} \end{aligned}$$

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน



ภาพ 15 กราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน
สมการเส้นตรง ; $y = 0.0287x - 0.0017$; $R^2 = 0.9995$

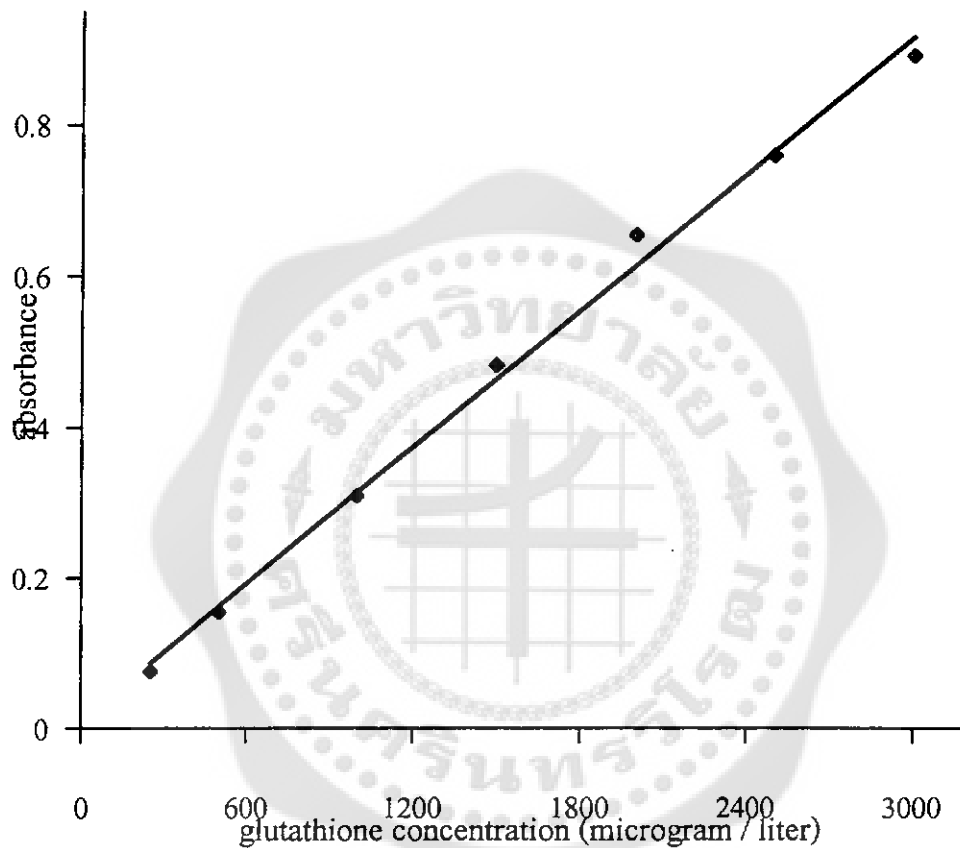
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ MDA



ภาพ 16 กราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ MDA

สมการเส้นตรง ; $y = 0.0289x - 0.0078$; $R^2 = 0.9997$

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glutathione



ภาพ 17 กราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glutathione

สมการเส้นตรง ; $y = 0.0003x + 0.0121$; $R^2 = 0.9953$