

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลในยีน RUNX3 สัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และการเกิดเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วิกรม วงศ์ไพบูลย์วัฒน*, ศรัณย์ ลิ้มปวีรรณ**, มธุรดา เพชรสังข์*, จุลินทร์ โอภาณรักษ์**, จุลินัส ดิษยบุตร*, ชานูชัย บุญหล้า*, อภิวัฒน์ มุทิตรากร***, ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์*

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** หน่วยศัลยศาสตร์ระบบทางเดินปัสสาวะ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลที่ยีน RUNX3 (RUNX3 methylation) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (total antioxidant status (TAS) และ protein carbonyl) ในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ แล้วประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับ RUNX3 methylation กับระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระดับ LINE-1 methylation

ผู้ป่วยและวิธีการศึกษา: กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 20 ราย และกลุ่มควบคุม จำนวน 18 ราย ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า (first morning urine) และเลือดแล้ววัดปริมาณการเติมหมู่เมทิลของ RUNX3 และ LINE-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ด้วยวิธี methylation-specific PCR และ combined bisulfate restriction analysis of LINE-1 (COBRA LINE-1) ตามลำดับ วัดระดับ total antioxidant status (TAS) ในปัสสาวะ และระดับ protein carbonyl ในพลาสมา ด้วยวิธี DPPH และ DNPH assay ตามลำดับ

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.048$) ผลการศึกษาระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชันพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ TAS ต่ำ แต่มีระดับ protein carbonyl สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$ และ $P<0.001$ ตามลำดับ) โดยระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ TAS แต่สัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ protein carbonyl ($r=-0.538$, $P=0.004$ และ $r=0.479$, $P=0.014$ ตามลำดับ) ขณะที่ระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ในผู้ป่วยต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P=0.012$) โดยระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ($r=-0.428$, $P=0.026$)

สรุป: ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ hyper-methylation ของ RUNX3 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุม สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดทางออกซิเดชัน และระดับ hypomethylation ของ LINE-1 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลไกการเกิดโรคที่แตกต่างกัน หรือความแตกต่างต่อการตอบสนองต่อความเครียดทางออกซิเดชันในแต่ละยีน

คำสำคัญ: มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ หมู่เมทิลที่ยีน RUNX3 ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน Line-1 methylation

Original article

Changes of DNA methylation in RUNX3 promoter with oxidative stress and LINE-1 methylation in bladder cancer patients

Wikrom Wongpaiboonwattana*, Srun Limpiwan**, Maturada Patchsung*, Julin Opanuraks**, Thasinas Dissayabutra*, Chanchai Boonla*, Apiwat Mutirangura***, Piyaratana Tosukhowong*

* Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

** Division of Urology, Department of surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital

*** Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Abstract

Objective: To determine whether methylation level at the RUNX3 promoter, a promoter of tumor-suppressor gene in peripheral blood-derived DNA was associated with levels of oxidative stress markers and methylation level at the long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1), as a reflective of global DNA methylation in bladder cancer (BCa) patients.

Material and Methods: Twenty BCa patients and 18 healthy individuals were recruited for the study. DNA methylation of RUNX3 and LINE-1 in peripheral blood cells was measured by methylation-specific PCR and combined bisulfite restriction analysis of LINE-1 (COBRA LINE-1). Urinary TAS and plasma protein carbonyl were determined by DPPH and DNPH methods, respectively.

Results: RUNX3 promoter methylation in peripheral blood cells of BCa patients were significantly higher than healthy controls ($P=0.048$). Urinary total antioxidant status (TAS) in BCa patients was significantly decreased, whereas plasma protein carbonyl was increased, compared to healthy controls ($P<0.001$ and $P<0.001$, respectively). Noticeably, RUNX3 methylation was negatively correlated with urinary TAS, but positively correlated with plasma protein carbonyl ($r=-0.538$, $P=0.004$ and $r=0.479$, $P=0.014$, respectively). Furthermore, LINE-1 methylation was significantly lower than healthy controls ($P=0.012$) and RUNX3 methylation was strongly negatively correlated with LINE-1 methylation ($r=-0.428$, $P=0.026$).

Conclusion: Patients with BCa demonstrated hypermethylation of RUNX3 promoter associated with oxidative status, and inversely correlated with LINE-1 hypomethylation. Epigenetic modulation in bladder carcinogenesis is not universal uniform, supposedly due to multiple mechanisms or variable gene susceptibility to the oxidative stress.

Keywords: bladder cancer, methylation level at the RUNX3, oxidative stress, LINE-1 methylation

บทนำ

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในผู้สูงอายุ อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้มีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วทุกภูมิภาคของโลก รวมไปถึงในประเทศไทยผู้สูงอายุอีกทั้งยังพบว่าเมื่อมีการรักษาแล้วยังไม่หายขาดได้และกลับเป็นซ้ำใหม่ พบว่าอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในประชากรชาย มากกว่าหญิง 3-4 เท่า ยังพบมากเป็นอันดับที่ 4 จากมะเร็งทั้งหมด มีอัตราการตาย 4 และ 1.1 คนต่อประชากร 100,000 คนในเพศชายและหญิงตามลำดับ¹ เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่ไม่มีอาการผิดปกติอย่างอื่นยกเว้นการพบปัสสาวะปนเลือดโดยไม่มีอาการเจ็บปวด ทำให้การตรวจพบมะเร็งชนิดนี้ล่าช้าด้วยเหตุนี้นักวิจัยจำนวนมากจึงมุ่งศึกษาที่จะหาสาเหตุ วิธีการป้องกัน และวิธีการตรวจสอบและรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ฉับไวและมีประสิทธิภาพ

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ มะเร็งชนิดไม่ลุกลามอยู่ที่เยื่อบุผิว (non muscle-invasive bladder cancer) และมะเร็งชนิดลุกลามเข้าสู่ชั้นกล้ามเนื้อ (muscle invasive cancer) หรือหากแบ่งตามชนิดของเซลล์แล้ว ชนิดที่พบมากที่สุดคือมะเร็งของเซลล์เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ (transitional cell หรือ urothelial carcinoma) พบสูงถึงร้อยละ 90 ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด และพบว่ามะเร็งชนิด non muscle-invasive transitional cell carcinoma มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำสูงถึงร้อยละ 80 ภายในระยะเวลา 5 ปีหลังการผ่าตัด (transurethral resection of bladder tumor (TUR-BT))²

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ (strong risk factors) ที่ได้รับการยืนยันว่าทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ การได้รับสารก่อมะเร็ง ที่สำคัญที่สุด คือ บุหรี่ ซึ่งมีสาร aromatic amines แร่ธาตุและกลุ่มธาตุโลหะหนักเป็นองค์ประกอบนอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะร้อยละ 5-25 มีปัจจัยเสี่ยงจากอาชีพการงาน เช่น การทำงานในเหมืองหรืองานที่เกี่ยวข้องกับโลหะ หรือผู้ที่มีการใช้ของโลหะหนักในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น จะมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสูงขึ้น รวมไปถึงอาชีพอื่นๆ เช่น บาร์เทนเดอร์ผู้ให้บริการด้านสุขภาพ เกษตรกร ช่างซ่อมเครื่องใช้ไฟฟ้า ผู้ประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับการสูดสาร

การขนส่ง และโรงงานต่างๆ³⁻⁶

กระบวนการเกิดมะเร็งนั้น เป็นกระบวนการที่ปัจจัยหลากหลายส่งผลร่วมกันในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติให้เป็นเซลล์มะเร็ง ทั้งที่มีผลเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอโดยตรง หรือกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงผ่านภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแก่ตัวของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ เป็นที่ทราบกันดีว่าความเครียดออกซิเดชันเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดมะเร็งรวมถึงมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซึ่งพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ^{7,8} ความเครียดออกซิเดชันยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการควบคุมระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic regulation) ที่สำคัญของเซลล์ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ที่มีการศึกษากันมากที่สุดในปัจจุบันในกระบวนการเกิดมะเร็ง⁹

ยีน RUNX3 (runt-related transcription factor 3) เป็นยีนหนึ่งที่มีบทบาทในการเจริญของสิ่งมีชีวิต และพบว่าเป็นยีนด้านการเกิดมะเร็งที่สำคัญ (tumor-suppressor gene) มีความสัมพันธ์กับการเกิดและการเป็นซ้ำของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของ RUNX3 มีผลทำให้ RUNX3 ถูกยับยั้งการแสดงออกเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของการเกิดมะเร็งหลายชนิดและมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งซ้ำได้¹⁰⁻¹⁴

Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1) เป็นทรานสโพซอน (Retrotransposon) ที่พบได้มากถึง 5 แสนชิ้นในจีโนมของมนุษย์ LINE-1 ที่พบในจีโนมมนุษย์นั้นอาจมีขนาดแตกต่างกันไปขึ้นกับกระบวนการจำลองตัวและการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น LINE-1 ทั้งหมดนั้นมีความยาวประมาณ 6 kb ประกอบด้วย 5' untranslated region (UTR) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของตัวเอง Open reading frame (ORF) สำหรับ RNA-binding protein ประมาณ 1 kb มี ORF สำหรับ endonuclease และ reverse transcriptase ยาวประมาณ 4 kb และส่วนของ 3' UTR และ poly A อีกเล็กน้อย เนื่องจากคุณสมบัติที่ LINE-1 กระจายตัวอยู่มากในจีโนมมนุษย์ประมาณร้อยละ 20 ของจีโนม จึงนิยมนำมาใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ global DNA methylation 28 การเติม

หมู่เมทิลที่ LINE-1 สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง โดยพบว่า ในมะเร็งหลายชนิดการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 จะต่ำกว่า คนปกติ¹⁵ รวมถึงในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่มีรายงานว่า LINE-1 hypomethylation สัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง¹⁶ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ วิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของยีน RUNX3 และตรวจวัดระดับ LINE-1 methylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของยีน RUNX3 และระดับการเกิด LINE-1 methylation กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งยังไม่มีรายงานข้อมูลนี้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระดับการเติมหมู่เมทิลที่ยีน RUNX3 (RUNX3 methylation) ซึ่งเป็นยีนด้านการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor gene) ศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (total antioxidant status (TAS) และ protein carbonyl) ในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ แล้วประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับ RUNX3 methylation กับระดับตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และระดับ LINE-1 methylation

ผู้ป่วยและวิธีการศึกษา

ประชากรและสารตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 19 คน และผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด urothelial carcinoma จำนวน 20 คน จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยเก็บตัวอย่างเลือด และปัสสาวะ (spot urine) จากอาสาสมัครทั้งหมด ซึ่งโครงการวิจัยดังกล่าวได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว พร้อมทั้งได้รับการยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) จากอาสาสมัครก่อน

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือด มาปั่นแยกพลาสมาและเม็ดเลือดขาว (buffy coat) จากนั้นเลือกเฉพาะส่วนเม็ดเลือดขาว

มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) ตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาว

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของยีน RUNX3

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวมาทำปฏิกิริยากับ bisulfite โดยใช้ชุดสำเร็จรูป EZ DNA methylation gold kit (ZymoResearch, CA, USA) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยาแล้วมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Homma¹⁷ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ RUNX3 ที่มีการเติมหมู่เมทิล (5'-ATA ATA GCG GTC GTT AGG GCG TCG-3' และ 5'-GCT TCT ACT TTC CCG CTT CTC GCG-3') และไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ RUNX3 ที่ไม่เติมหมู่เมทิล (5'-ATA ATA GTG GTT GTT AGG GTG TTG-3' และ 5'-ACT TCT ACT TTC CCA CTT CTC ACA-3') ปฏิกิริยาประกอบด้วย MgCl₂ 2.1 mM ไพรเมอร์เส้นละ 0.2 mM dNTP ชนิดละ 0.2 mM Q-solution 20% (v/v) และ HotstartTaq DNA polymerase 1 U (Qiagen, Hilden, Germany) ปฏิกิริยา PCR นั้นใช้ initial denaturation ที่ 95°C 15 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation 94°C 30 วินาที, annealing 59°C (สำหรับ RUNX3 ที่ถูกเติมหมู่เมทิล) หรือ 48°C (สำหรับ RUNX3 ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล) นาน 60 วินาที Extension 72°C 60 วินาที จำนวน 35 รอบ แล้วทำ final extension 72°C 10 นาที แล้วดูผลผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย 8% nondenaturing polyacrylamide gel

วัดปริมาณความเข้มของ band (ขนาด 115 bp) ที่เพิ่มปริมาณได้จากไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ RUNX3 ที่มีการเติมหมู่เมทิล (methylated RUNX3, M) และความเข้มของ band (ขนาด 115 bp) ที่เพิ่มปริมาณได้จากไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ RUNX3 ที่ไม่เติมหมู่เมทิล (unmethylated RUNX3, U) จากนั้นคำนวณสัดส่วนของ methylated RUNX3 ต่อ unmethylated RUNX3 (M/U ratio) ในแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอทำการวัดซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

การวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1

นำดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยากับ bisulfite แล้วตามวิธีข้างต้น มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ

Chalitchagorn และคณะ¹⁵ โดยใช้ forward primer คือ 5'-CCG TAA GGG GTT AGG GAG TTT TT-3' และ reverse primer คือ 5'-RTA AAA CCC TCC RAA CCA AAT ATA AA -3' โดยไพรเมอร์คู่นี้ ออกแบบจากส่วน 5'UTR ของลำดับเบส LINE-1.2 (NCBI Accession Number M80343) ซึ่งบริเวณดังกล่าวอยู่ในส่วนของ promoter ของ LINE-1 ปฏิบัติ PCR ประกอบด้วย $MgCl_2$ 2.5 mM ไพริเมอร์เส้นละ 0.2 mM dNTP ชนิดละ 0.2 mM และ HotstartTaq DNA polymerase 1 U โดยใช้ initial denaturation ที่ 95°C 15 นาที และขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วย denaturation 95°C, annealing 50°C, extension 72°C ขั้นตอนละ 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วทำ final extension 72°C 7 นาที จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ TaqI และ TasI อย่างละ 2 unit นาน 16 ชั่วโมง แล้วดูผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย 8% nondenaturing acrylamide gel นำความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาคำนวณตามวิธีของผู้พัฒนาเทคนิค

การวิเคราะห์ protein carbonyl

วิเคราะห์ปริมาณ protein carbonyl ในพลาสมาด้วยวิธี dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay¹⁸ ซึ่งมีวิธีโดยสังเขปคือ นำพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างมาเจือจาง 20 เท่า ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับ DNPH ในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยากับ 20% trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ล้างตะกอน แล้วละลายด้วย guanidine hydrochloride จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับพลาสมาที่ทำปฏิกิริยากับ 2N HCl แทนขั้นตอนการเติม DNPH นำค่าที่ได้มาคำนวณแล้วรายงานเป็นปริมาณของโปรตีนคาร์บอนิลต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ในการวัดปริมาณโปรตีนวัดโดยวิธี dye binding method¹⁹ โดยใช้สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ใน phosphoric acid ทำปฏิกิริยากับพลาสมาเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ 595 นาโนเมตร

การวัดปริมาณ total antioxidant status (TAS)

นำปัสสาวะมาทำปฏิกิริยากับ 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซีในหน่วยโมลาร์ เรียกว่า vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)²⁰

ผลการศึกษา

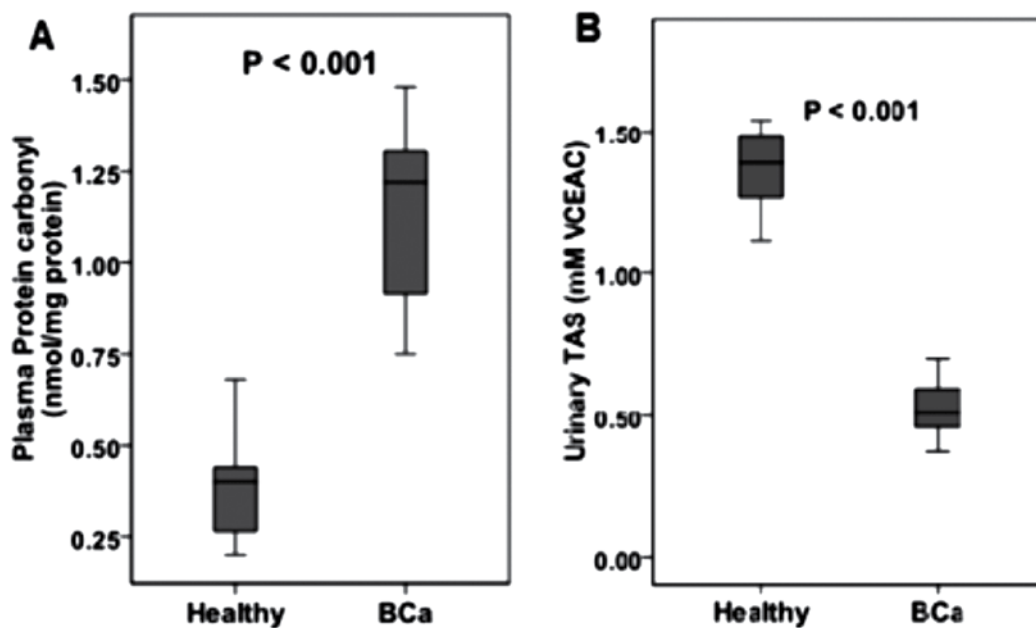
รวบรวมอาสาสมัครผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และคนปกติจำนวน 20 และ 18 รายตามลำดับซึ่งมีอายุและเพศใกล้เคียงกัน แบ่งเป็นผู้ป่วยเพศชาย 15 คน (ร้อยละ 75.00) และผู้ป่วยเพศหญิง 5 คน (ร้อยละ 25.00) คน ปกติเพศชาย 17 คน (ร้อยละ 94.44) และคนปกติเพศหญิง 1 คน (ร้อยละ 5.56) อายุเฉลี่ยในกลุ่มผู้ป่วยเท่ากับ 68.71 ± 11.91 ปี และในกลุ่มคนปกติเท่ากับ 63.83 ± 7.79 ปี ค่าเฉลี่ยของดัชนีมวลกาย (body mass index: BMI) ในกลุ่มผู้ป่วยเท่ากับ 21.93 ± 4.07 และในกลุ่มคนปกติเท่ากับ 22.73 ± 2.68 จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าอายุ เพศ และ BMI ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ปริมาณ oxidative stress ในอาสาสมัครปกติ และผู้ป่วย

เมื่อเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ในพลาสมาของคนปกติและผู้ป่วย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) โดยระดับ protein carbonyl ในผู้ป่วยมีระดับสูงกว่าคนปกติ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.14 ± 0.24 และ 0.38 ± 0.12 nmol/mg protein ตามลำดับ (รูปที่ 1A) และเมื่อเปรียบเทียบระดับ TAS ในประชากร 2 กลุ่ม พบว่าในผู้ป่วยมีระดับ TAS ต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($P < 0.001$) โดยในผู้ป่วยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.52 ± 0.11 mM VCEAC ส่วนในคนปกติมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.36 ± 0.14 mM VCEAC (รูปที่ 1B) ซึ่ง แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยมีระดับ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ

ตารางที่ 1 ข้อมูลจำนวน เพศ อายุ และค่า BMI ของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติ

	กลุ่มตัวอย่าง		P value
	ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	คนปกติ	
จำนวน (ราย)	20	18	
เพศ			0.089
- ชาย	15 (75.00%)	17 (94.44%)	
- หญิง	5 (25.00%)	1 (5.56%)	
อายุ (ปี) (mean $\pm$ SD)	68.71 $\pm$ 11.91	63.83 $\pm$ 7.79	0.159
BMI (kg/m ²) (mean $\pm$ SD)	21.93 $\pm$ 4.07	22.73 $\pm$ 2.68	0.542

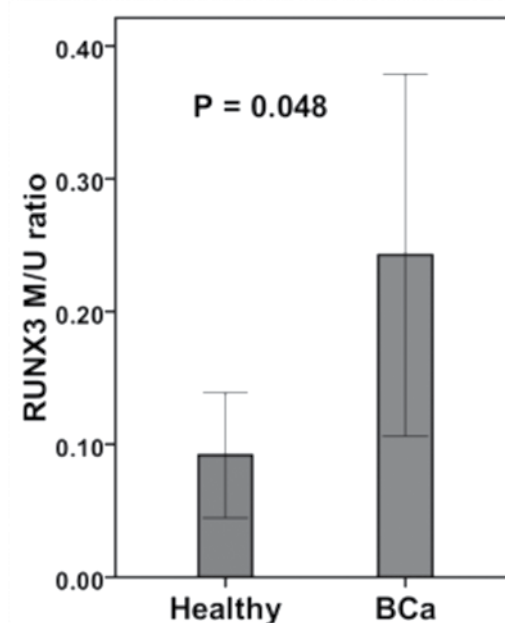
รูปที่ 1 การเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ในพลาสมา (A) และระดับ total antioxidant status (TAS) ในปัสสาวะ (B) ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติ โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ protein carbonyl สูง แต่มีระดับ TAS ต่ำ กว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

การเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของ RUNX3 ในอาสาสมัครปกติและผู้ป่วย

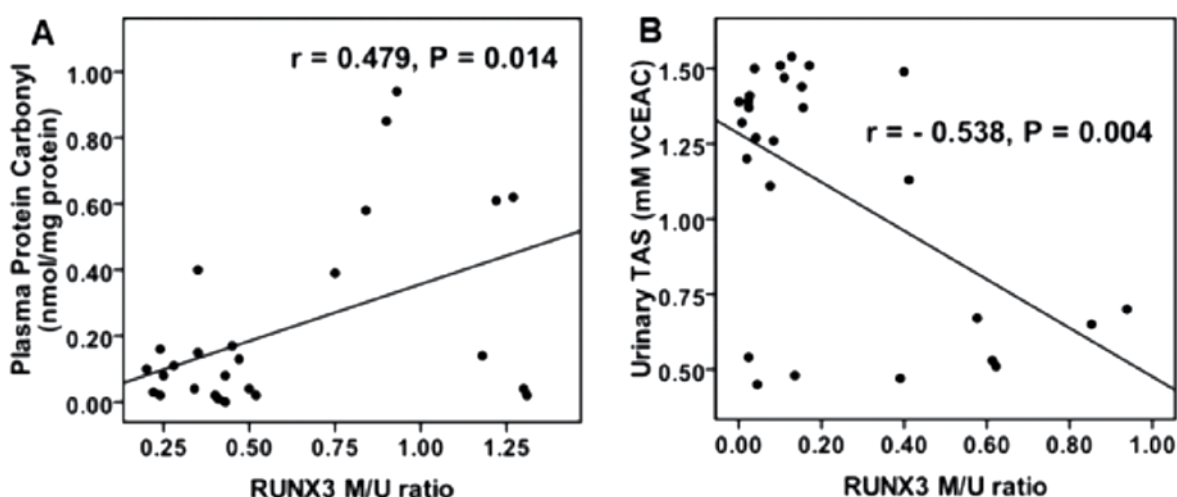
เมื่อวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ทั้งปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อ RUNX3 ที่เติมและไม่เติมหมู่เมทิล จากนั้นนำปริมาณที่ได้มาคิดเป็นอัตราส่วนระหว่าง RUNX3 ที่เติมหมู่เมทิล ต่อ RUNX3 ที่ไม่เติมหมู่เมทิล (M/U ratio) แล้วเปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วย พบว่าในผู้ป่วยมีการเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของ RUNX3 มากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.048$) มีค่าเฉลี่ยที่ 0.24 ± 0.31 และ 0.09 ± 0.09 ตามลำดับ (รูปที่ 2)

ความสัมพันธ์ระหว่าง oxidative stress และการเติมหมู่เมทิลที่โปรโมเตอร์ของ RUNX3

เมื่อนำ M/U ratio ของ RUNX3 มาหาค่าความสัมพันธ์กับปริมาณ protein carbonyl และ TAS พบว่า RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ protein carbonyl ($r = 0.479$, $P = 0.014$) ดังที่แสดงในรูป 3A และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ TAS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = -0.538$, $P = 0.004$) ดังที่แสดงในรูป 3B



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบระดับอัตราส่วนระหว่าง RUNX3 ที่เติมหมู่เมทิลต่อ RUNX3 ที่ไม่เติมหมู่เมทิล (RUNX3 M/U ratio) ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและกลุ่มคนปกติ โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีระดับ RUNX3 M/U ratio สูงกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.048$)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง RUNX3 M/U ratio กับระดับ protein carbonyl ในพลาสมา (A) และระดับ TAS ในปัสสาวะ (B) ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด โดยระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ protein carbonyl แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ TAS ($r = 0.479$, $P = 0.014$ และ $r = -0.538$, $P = 0.004$ ตามลำดับ)

การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ในอาสาสมัครปกติ และผู้ป่วย

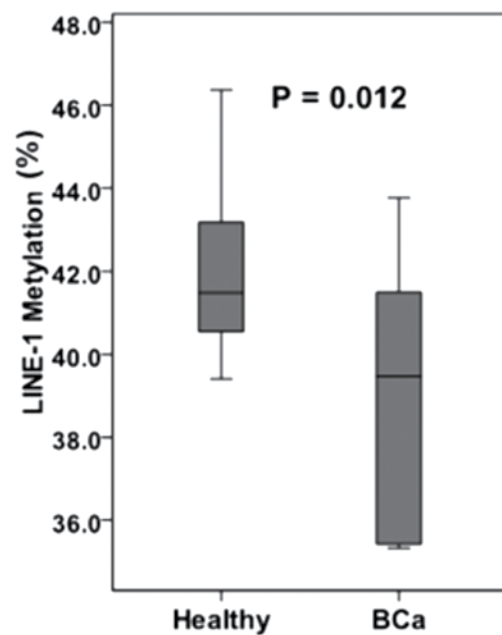
เมื่อนำระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 มาเปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าในคนปกติมีระดับการเติมหมู่เมทิลเฉลี่ย $41.99 \pm 1.90\%$ มากกว่าการเติมหมู่เมทิลของผู้ป่วยซึ่งมีค่าเฉลี่ย $38.99 \pm 3.16\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.012$) ดังแสดงในรูปที่ 4

ความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่เมทิลที่ โปรโมเตอร์ของยีน RUNX3 และ LINE-1

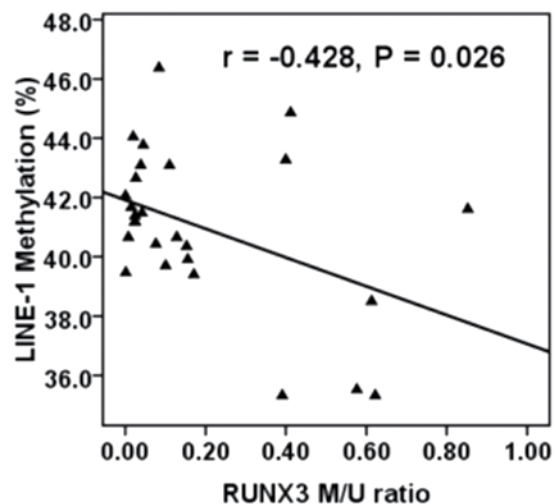
เมื่อเปรียบเทียบระดับการเติมหมู่เมทิลทั้งสองตำแหน่ง พบว่าการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=-0.428$, $P=0.026$) ในรูปที่ 5

วิจารณ์

การศึกษากวาระเครียดจากออกซิเดชันกับการศึกษาถึงกลไกการควบคุมเหนือพันธุกรรมและการเกิดโรคมะเร็งกำลังได้รับความสนใจศึกษาเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน สำหรับการศึกษาในระดับของ protein carbonyl และ TAS ในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เพื่อดูระดับความเครียดจากออกซิเดชันในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มของงานวิจัยนี้ พบว่าในผู้ป่วยมีระดับความเครียดจากออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ โดยมีระดับ protein carbonyl ที่สูง และระดับ TAS ที่ต่ำเมื่อเทียบกับคนปกติ เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นหมู่คาร์บอนิลซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดระดับความเครียดจากออกซิเดชันได้²¹⁻²³ ส่วนระดับ TAS ที่ต่ำในผู้ป่วยแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมีปริมาณอนุมูลอิสระที่สูง สารต้านอนุมูลอิสระจึงถูกใช้ไปมาก ทำให้สามารถวัดปริมาณได้น้อยลง เป็นการยืนยันได้ว่าความเครียดจากออกซิเดชันมีบทบาทในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ²⁴ และเมื่อเปรียบเทียบการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 และ LINE-1 แล้ว พบว่าในผู้ป่วยจะมีระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 สูงกว่าคนปกติ ซึ่ง RUNX3 ที่เป็นยีนด้านการเกิดมะเร็ง เมื่อถูกเติมหมู่เมทิลจะลดการแสดงออกออก แต่การเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ในผู้ป่วย ต่ำกว่าคนปกติ ซึ่งการเติมหมู่เมทิลลดลง จะทำให้ LINE-1 แสดงออกได้มากขึ้น LINE-1



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบระดับการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และกลุ่มคนปกติ โดยร้อยละการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ในผู้ป่วยต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.012$)



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง RUNX3 M/U ratio กับร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด โดยระดับการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ($r = -0.428$, $P = 0.026$)

ซึ่งเป็นทรานสโทซอนจะสามารถเคลื่อนย้ายและทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมได้ (genomic instability)²⁵ และเมื่อเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ แสดงให้เห็นว่าระดับความเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเติมหมู่เมทิลมากขึ้นที่ RUNX3 ทำให้ยีนต้านมะเร็งมีการแสดงออกลดลง ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้อาจเกิดจากกลไกใดนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่กลไกหนึ่งที่ถูกเสนอไว้กล่าวว่า เมื่อความเครียดจากออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อัตราส่วนระหว่าง NAD⁺ ต่อ NADH จะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการกระตุ้นโปรตีนหลายชนิดไปรวมตัวกันที่ CpG island เรียกว่า polycomb complex ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะทำให้โครมาตินบริเวณนั้นเปลี่ยนแปลงเป็น heterochromatin²⁶ นอกจากนี้ยังส่งผลให้ DNMT มีแอกติวิตีสูงขึ้นและถูกเหนี่ยวนำให้เติมหมู่เมทิลในตำแหน่งของโปรโมเตอร์นั้นด้วย²⁷ นอกจากนี้การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่เมทิลที่ RUNX3 และ LINE-1 พบว่ามีทิศทางความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงลบ ซึ่งแสดงว่าการเติมหมู่ เมทิลของ LINE-1 หรือของทั้งจีโนมที่ต่ำลงสัมพันธ์กับการเติมหมู่เมทิลที่ยีนต้านมะเร็ง RUNX3 ที่สูงขึ้น และจากการศึกษาของคณะก่อนหน้านี้นี้พบว่าระดับการเติมหมู่เมทิลของ LINE-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต่ำลงสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้น²⁸ ด้วยเหตุนี้ความเครียดออกซิเดชันจึงน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยอาจเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลทั้งบริเวณที่เป็นยีนและบริเวณที่ไม่ใช่ยีน และอาจมีกลไกที่แตกต่างกันที่ส่งผลให้การกระตุ้นด้วยความเครียดออกซิเดชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ทั้งการเพิ่มและการลดเมทิลเลชันในดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ตระหนักดีว่าความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และระดับการเติมหมู่เมทิลที่พบนั้น ไม่ได้หมายถึงการเป็นสาเหตุ (causation) ไม่ว่าทิศทางใด โดยการจะเป็นสาเหตุได้นั้นยังต้องมีเหตุผลต่างๆ ประกอบอีกหลายอย่าง ซึ่งเหตุผลและกลไกเหล่านี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เป้าหมายในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีหลายประการ ได้แก่ 1. การกำจัดหรือตัดก้อนมะเร็งออก 2. การป้องกันการเกิดมะเร็งซ้ำ 3. การป้องกันการลุกลามและการพัฒนาของมะเร็งเป็นชนิดที่รุนแรงขึ้น 4. การประคับประคองให้กระเพาะปัสสาวะ

ทำหน้าที่ปกติได้ และ 5. การช่วยให้ผู้ป่วยมีกำลังใจและคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน RUNX3 และ LINE-1 ครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่เสนอว่า การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน RUNX3 และ LINE-1 สามารถพัฒนามาใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ หรือใช้ในการพยากรณ์โรคได้²⁸ และเป็นวิธีที่ง่าย เนื่องจากสามารถตรวจหาได้จากดีเอ็นเอเม็ดเลือดขาว ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจจากเซลล์กระเพาะปัสสาวะโดยตรง^{10,29} ซึ่งหากผู้ป่วยสามารถรู้ถึงความเสี่ยงได้ล่วงหน้า ก็จะทำให้การป้องกันหรือการรักษาทำได้ง่ายและอาจมีการศึกษาตัวบ่งชี้ดังกล่าวในการตอบสนองต่อการรักษาทางเคมีบำบัดในอนาคตได้ และเพิ่มโอกาสในการหายขาดจากโรคได้ นอกจากนี้ความผิดปกติในกระบวนการควบคุมระดับเนื้อพันธุกรรมนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงให้พวกกลับมาเป็นปกติได้เหมือนเดิม จึงน่าสนใจว่าหากมีการสร้างเสริมความสามารถในการดูแลตนเองให้ผู้ป่วยสามารถควบคุมปรับเปลี่ยนการดำเนินชีวิตที่สำคัญ 4 ประการ ได้แก่ 1. การรับประทานอาหารที่ได้สัดส่วน มีไขมันอิ่มตัวน้อย ลดอาหารที่มีเนื้อแดง เน้นบริโภคผักสีเขียวและผลไม้ที่หลากหลาย 2. การออกกำลังกายให้เพียงพอเหมาะสม 3. การผ่อนคลายความเครียด และ 4. จัดกลุ่มให้ความช่วยเหลือ (group support) ให้คำปรึกษา และการเสริมสร้างกำลังใจ (empowerment) จะทำให้อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซาลดลงได้

สรุป

ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีภาวะ hypermethylation ของ RUNX3 เซลล์เม็ดเลือดขาวและภาวะออกซิเดชันสูงกว่าคนปกติ การศึกษานี้บ่งชี้ว่าระดับ RUNX3 promoter methylation ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่สูงขึ้น และสัดส่วน hypomethylation ที่เพิ่มขึ้นใน LINE-1 ความแตกต่างของ epigenetic change ที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากกลไกการเกิดโรคแตกต่างกัน หรือ การตอบสนองของยีนแต่ละชนิดต่อความเครียดทางออกซิเดชันต่างกัน การศึกษาเพิ่มเติมถึงสาเหตุของความแตกต่างนี้จะทำให้เราเข้าใจในพยาธิกำเนิด รวมไปถึงแนวทางการป้องกันและรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* 2011;59(6):997-1008.
2. Bravaccini S, Casadio V, Amadori D, et al. The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *Indian J Urol* 2009;25(1):40-6.
3. Ward EM, Sabbioni G, DeBord DG, et al. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(15):1046-52.
4. Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J* 2006;99(11):1256-63.
5. Cassidy A, Wang W, Wu X, et al. Risk of urinary bladder cancer: a case-control analysis of industry and occupation. *BMC Cancer* 2009; 9:443.
6. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res* 2009;674(1-2):36-44.
7. Yilmaz IA, Akçay T, Çakatay U, et al. Relation between bladder cancer and protein oxidation. *Int Urol Nephrol* 2003;35(3):345-50.
8. Wayakkanont A, Opanuraks J, Kittikowit W, et al. Efficacy of combined treatment between lime powder and curcumin supplementation on reduction of superficial bladder cancer recurrence: A preliminary randomized controlled trial. *Chula Med J* 2009;53(3):199-214.
9. Wachsmann JT. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;375(1):1-8.
10. Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, et al. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008;180(3):1141-5.
11. Imamura Y, Hibi K, Koike M, et al. RUNX3 promoter region is specifically methylated in poorly-differentiated colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005;25(4):2627-30.
12. Li QL, Kim HR, Kim WJ, et al. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(1):223-8.
13. Lau QC, Raja E, Salto-Tellez M, et al. RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer. *Cancer Res* 2006;66(13):6512-20.
14. Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004;84(4):479-84.
15. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23(54):8841-6.
16. Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* 2010; 16(5):1682-9.
17. Homma N, Tamura G, Honda T, et al. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci* 2006;97(1):51-6.
18. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233: 346-57.



19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
20. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(3):231-6.
21. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272(33):20313-6.
22. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000;33 Suppl:S99-108.
23. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(9):797-803.
24. Brown NS, Streeter EH, Jones A, et al. Cooperative stimulation of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and reactive oxygen species: the effect of targeting vascular endothelial growth factor and oxidative stress in an orthotopic xenograft model of bladder carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(9):1696-701.
25. Kazazian HH, Jr., Goodier JL. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 2002;110(3):277-80.
26. O'Hagan HM, Wang W, Sen S, et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 2011;20(5):606-19.
27. Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439(7078):871-4.
28. Patchsung M, Boonla C, Amnattrakul P, et al. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One* 2012;7(5):e37009.
29. Woo HD, Kim J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(4):e34615.