ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและไลปิดเปอร์ออกซิเดชั่นใน Acute Lymphocytic Leukemia

อธิป ลิขิตลิลิต วท.ม.*

ประยูร ถนอมสุข กศ.บ.**

เรื่องย่อ : มีหลักฐานมากมายที่สนับสนุนว่าอนุมูลเสรีของออกซิเจนเป็นตัวกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนทั้งระดับร่างกาย (phenotypes) และระดับยีน (genotypes) ซึ่งจะนำไปสู่การกลายพันธุ์ไปจนถึงการเกิดมะเร็ง ความไม่สมดุลของระบบป้องกันตนเองจากภาวะออกซิเดชั่นของอนุมูลเสรีของออกซิเจนในเซลล์มะเร็งก็มีผลต่อความว่องไวและการรักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะเลือดจางซึ่งเกิดขึ้นจากการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงก็มักจะพบในผู้ป่วยมะเร็งด้วย ดังนั้นการศึกษาปัจจัยบางชนิด ซึ่งเป็นดัชนีของภาวะออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) เช่น ไลปิดเปอร์ออกซิเดชั่น โดยการหาปริมาณของมาลอนไดอัลดีฮัยด์ (MDA) และการทำงานของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจน เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ก็สามารถประเมินภาวะออกซิเดทีฟ-สเตรสในผู้ป่วยมะเร็งได้ จากหลักการดังกล่าวจึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีปริมาณของ MDA ทั้งในพลาสมาและเม็ดเลือดแดงสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (28.10 ± 2.90 µmol/L vs. 9.20 ± 0.30 µmol/L, $p < 0.0001$ และ 3.00 ± 0.20 nmol/gHb vs. 1.20 ± 0.10 nmol/gHb, $p< 0.0001$ ตามลำดับ) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ SOD พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีระดับต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($1,966 \pm 110$ U/gHb vs. $3,095 \pm 60$ U/gHb, $p < 0.0001$) และเมื่อศึกษาสหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวระหว่างการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมา กับจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวของการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin การศึกษานี้ชี้แนะว่าอนุมูลเสรีของออกซิเจนที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการพร่องของเอนไซม์ SOD สอดคล้องกับปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ MDA ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia

---

*ภาควิชาชีวเคมี, **ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700

Abstract : Superoxide Dismutase and Lipid Peroxidation in Acute Lymphocytic Leukemia

Likidlilid A, M.Sc.,* Thanomsuk P, B.Ed.**

*Department of Biochemistry, ** Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

Siriraj Hosp Gaz 1999; 51: 514-523.

There is much evidence suggesting a possible role of reactive oxygen species and other free radicals as mediators of phenotypic and genotypic changes that lead from mutation to cancer. The imbalance in cancer cell antioxidant defense mechanism can influence also the sensitivity to cytoreductive therapy. In erythrocytes, it can result in hemolysis which is one of the pathogenic mechanisms of anemia in cancer patients. Parameters of lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) and antioxidant enzymes here represented by superoxide dismutase (SOD) have been investigated in acute lymphocytic leukemia. Twenty patients of various stages and activities of the disease and twenty five normal controls were recruited. Significantly higher concentrations of total MDA in plasma (28.10 $\pm$ 2.90 µmol/L vs. 9.20 $\pm$ 0.30 µmol/L, $p < 0.0001$) as well as in erythrocytes (3.00 $\pm$ 0.20 nmol/gHb vs. 1.20 $\pm$ 0.10 nmol/gHb, $p < 0.0001$) were found compared to the control group. Significantly lower activity of SOD (1,966 $\pm$ 110 U/gHb vs. 3,095 $\pm$ 60 U/gHb, $p < 0.0001$) was also observed. No correlations were obtained between SOD activity, MDA concentration in both red cells and plasma with blast cell count and hemoglobin concentration. This study suggests that free radicals are associated with an impaired antioxidant defense enzyme activity resulting in increased lipid peroxidation in acute lymphocytic leukemia.

ภาวะที่เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตต้องอยู่ภายใต้อนุมูลเสรีของออกซิเจนในปริมาณมาก ๆ และเกิดขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว เรียกว่าออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) ภาวะนี้จะนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคหลายชนิด เช่น การอักเสบ (inflammation), เบาหวาน (diabetes mellitus), ข้ออักเสบ (arthritis), และมะเร็ง (cancer) นอกจากนี้ยังพบว่ายาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษามะเร็ง รวมทั้งสารพวก tumor necrosis factor, interleukin-1, และ photodynamic therapy ก็ก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งภาวะนี้จะมีผลในการทำลายเซลล์มะเร็งได้[1,2] อย่างไรก็ตามในเซลล์ปกติก็มีระบบของเอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจน (antioxidant enzymes) ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น (inducible) โดยอนุมูลเสรีของออกซิเจนเอง ด้วยเหตุนี้ระดับของเอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนจึงสะท้อนให้เห็นถึงระดับของซับสเตรตซึ่งก็คืออนุมูลเสรีของออกซิเจน หรือ active oxygen species นั่นเอง Active oxygen species เหล่านี้มักจะรวมถึง oxygen radicals เช่น superoxide radicals, hydroxyl radicals และ peroxyl radicals กับ reactive oxygen species เช่น hydrogen peroxide และ singlet oxygen เป็นต้น ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการได้รับรังสีที่เกิดจากการแตกตัวของสาร (ionizing radiation), รังสีอัลตร้าไวโอเล็ต (ultraviolet light) และสารเคมี (chemicals) บางชนิดจะก่อให้เกิด active oxygen species ขึ้น โดย active oxygen species เหล่านี้จะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยกระบวนการไลปิด

เปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ได้ผลผลิตเป็นมาลอนไดอัลดีฮัยด์ (MDA) หรืออาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ซึ่งในที่สุดจะเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การเกิดมะเร็ง[3]

สำหรับในเซลล์มะเร็งก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของอนุมูลเสรีของออกซิเจนต่อการเกิดเซลล์มะเร็ง ส่วนใหญ่พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนโดยเฉพาะซุปเปอร์อ็อกไซด์-ดิสมิวเตส (SOD) จะมีระดับต่ำกว่าคนปกติ[4-10] ขณะเดียวกันจะมีปริมาณของ MDA สูงกว่าคนปกติ [4,9] แต่ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) พบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ กล่าวคือ Yamanaka และคณะ[11], Kokoglu และคณะ[12], Stoklasova และคณะ[13] และ Abbel-Aziz และคณะ[14] พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD จะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว ขณะที่ Yoshimitsu และคณะ[15], Saito[16] และ Arruda และคณะ[17] กลับพบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD มีระดับต่ำลงในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว อย่างไรก็ตามเมื่อเร็ว ๆ นี้ Sun[18] และ Van Poppel และคณะ[19] พบว่าอนุมูลเสรีของออกซิเจนมีบทบาทที่สำคัญในการทำให้เกิดมะเร็ง โดยพบว่า antioxidants ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำลายอนุมูลเสรีของออกซิเจนสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งได้ ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาว่าภาวะออกซิเดทีฟสเตรสมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia ในคนไทยหรือไม่ โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ SOD ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ทำลายอนุมูลเสรีของออกซิเจนกับปริมาณของ MDA ซึ่งเป็นดัชนีของปฏิกิริยาไลปิดเปอร์-ออกซิเดชั่น

วัตถุและวิธีการ

1. กลุ่มผู้รับการทดลอง

1.1 กลุ่มคนปกติ เป็นผู้มาบริจาคเลือด ณ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 25 ราย เป็นชาย 15 ราย หญิง 10 ราย อายุระหว่าง 21-49 ปี อายุเฉลี่ย 31.12 ± 6.50 ปี พบว่าทั้งหมดมีค่าข้อมูลทางโลหิตวิทยา (hematological data) ปกติ

1.2 กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia จำนวน 20 ราย เป็นชาย 11 ราย หญิง 9 ราย อายุระหว่าง 12-71 ปี อายุเฉลี่ย 32.15 ± 16.02 ปี ผู้ป่วยทุกรายได้รับการตรวจวินิจฉัยที่สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยผู้ป่วยทุกคนไม่ได้รับยารักษามะเร็งก่อนการศึกษา

2. การเตรียมเม็ดเลือดแดง

เจาะเลือดจากผู้ป่วยและคนปกติทาง venipuncture โดยใช้ lithium heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง แล้วนำมาปั่นแยกพลาสมาที่ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที แยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดงโดยใช้ microcrystalline cellulose/α-cellulose column chromatography [20] จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงมาล้าง ด้วย 5 mM phosphate buffer saline, pH 7.8 3 ครั้งแล้วเจือจางให้เป็น 50% red cell suspension ด้วย buffer ดังกล่าว

3. การวิเคราะห์การทำงาของเอนไซม์ซุปเปอร์อ็อกไซด์ดิสมิวเตส

นำ 0.4 มล. ของ 50% red cell suspension ที่ได้มาทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย 1.5 ปริมาตรของน้ำกลั่นที่เย็น (4°ซ.) แล้วตกตะกอน hemoglobin ด้วย 0.25 ปริมาตรของ elthanol ที่แช่แข็ง (-20°ซ.) และ 0.15 ปริมาตรของ chloroform ที่แช่แข็ง (-20°ซ.) จากนั้นนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาการทำงานของเอนไซม์ SOD ตามวิธีของ Winterbourn และคณะ [21] โดยอาศัยหลักการที่ว่าเอนไซม์ SOD จะยับยั้งการรีดิวซ์ nitroblue tetrazolium โดย superoxide radical ที่ได้มาจากปฏิกิริยา photoreduction ของ riboflavin กับออกซิเจน

4. การหาปริมาณมาลอนไดอัลดีฮัยด์ในเม็ดเลือดแดง

เติม 4 มล. ของ N/12 H_2SO_4 และ 0.5 มล. ของ 10% phosphotungstic acid ลงไปใน100 มล. ของ 50% red cell suspension เพื่อตกตะกอน hemoglobin จากนั้นนำไปปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส แล้วเติม 1 มล. ของ 5 mM phosphate buffer saline, pH 7.8 ที่มี sodium azide 26 มก./ดล. ลงไปในตะกอน และเติม 1 มล. ของ 0.75% H_2O_2 ลงไป โดย sodium azide จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ catalase ขณะที่ H_2O_2 จะช่วยปลดปล่อย MDA ออกจากผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงเติม 1 มล. ของ 56 กรัม/ดล. trichloroacetic acid ที่มี sodium arsenite 2.6 กรัม เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำไปปั่นที่ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 500 µl ของ 1% thiobarbituric acid นำไปบ่มที่ 95°ซ. เป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปหาปริมาณของ MDA โดยวัดความทึบแสงที่ 535 nm ตามวิธีการของ Cynamon และคณะ[22]

5. การหาปริมาณมาลอนไดอัลดีฮัยด์ในพลาสมา

เติม 200 µl ของพลาสมาลงไปใน 650 µl ของ 7.6 mM 1-methyl-2 phenylindole ใน 33% methanol ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ MDA จากนั้นเติม 150 µl ของ 10 M HC1 เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำไปบ่มที่ 45°ซ. เป็นเวลา 60 นาที จึงนำไปปั่นที่ 10,000x g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายไปวัดความทึบแสงที่ 586 nm ตามวิธีการของ McCusker และคณะ[23]

6. วิธีทางสถิติ

ข้อมูลทุก ๆ ค่าจะถูกแสดงเป็น mean ± SE (standard error of the mean) ความแตกต่างระหว่างค่าของข้อมูลจะถูกวิเคราะห์โดย Student's unpaired t-test และ simple linear correlation coefficient โดยใช้ Statview for Windows (Abacus Concepts, Inc.) ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

ตารางที่ 1 แสดงค่าข้อมูลทางโลหิตวิทยา (hematological data) ของคนปกติเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia พบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีจำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณของ hemoglobin น้อยกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (blast cells) อยู่ในช่วง 9.03 ± 10.96 x 10^4 เซลล์/มล. ขณะที่คนปกติจะไม่พบมะเร็งของเม็ดเลือด

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย (mean ± SE) ของค่าข้อมูลทางโลหิตวิทยาของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia

Subjects	Hb (g%)	RBC ($x10^{12}$ cells/L)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g%)	Blast cells ($x\ 10^4$ cells/ml)
Normal control (n=25)	14.57±1.45	5.61±1.09	86.65±7.88	29.10±2.59	34.00±2.17	-
Acute lymphocytic leukemia (n=20)	8.95±2.72	3.38±1.27	66.80±6.26	26.00±2.73	30.25±2.21	9.03±10.96

เมื่อศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีระดับต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ตรงกันข้ามปริมาณของ MDA ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีระดับสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean ± SE) การทำงานของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และปริมาณมาลอนไดอัลดีฮัยด์ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia

Subjects	SOD activity (U/gHb)	MDA content (nmol/gHb)
Normal control (n = 25)	3,095 ± 60	1.20 ± 0.10
Acute lymphocytic leukemia (n = 20)	1,966 ± 110*	3.00 ± 0.20*

*Statistically different from normal control at $p < 0.0001$.

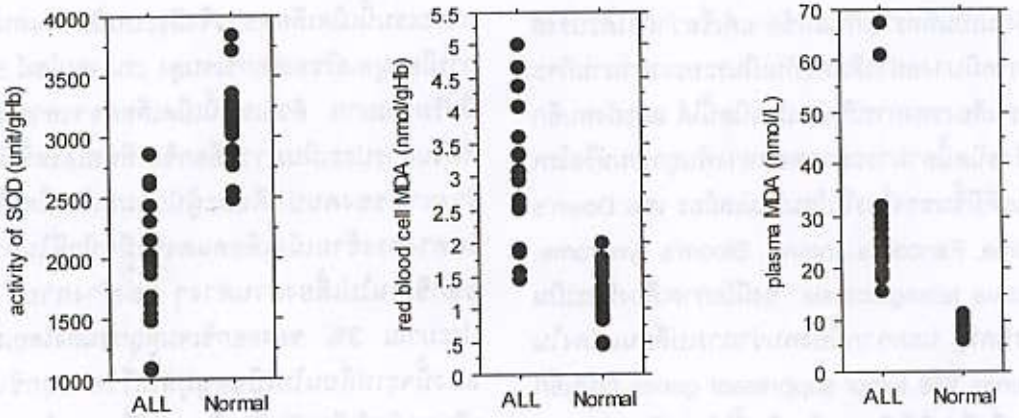
นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้วัดปริมาณของ MDA ในพลาสม่าของคนปกติเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia พบว่าระดับของ MDA ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีปริมาณสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในเม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย (mean ± SE) ความเข้มข้นของ MDA ในพลาสมาของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia

Subjects	MDA content (μmol/gHb)
Normal control (n = 25)	9.20 ± 0.30
Acute lymphocytic leukemia (n = 20)	28.10 ± 2.90*

*Statistically different from normal control at $p < 0.0001$.

สำหรับการกระจายข้อมูลต่าง ๆ ของเอนไซม์ SOD และปริมาณ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia ได้แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงระดับการทำงานของเอ็นซัยม์ SOD และปริมาณของ MDA ในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia

อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าตัวแปร เช่นการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมามาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียว (simple linear correlation coefficient, r) เทียบกับจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณของ hemoglobin และจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับขนาดของตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง คณะผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์นี้ เนื่องจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งทั้งที่รุนแรงและไม่รุนแรงจะตรวจไม่พบว่ามีขนาดของตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลืองโต

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวระหว่างการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ในเม็ดเลือดแดงและพลาสมา กับจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin

	Blast cells	Hb
SOD	r = -.1244, p = 0.60	r = .1039, p = 0.66
Red cell MDA	r = -.0315, p = 0.90	r = .2434, p = 0.30
Plasma MDA	r = .3864, p = 0.09	r = -.1202, p = 0.61

วิจารณ์

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia จัดเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบได้บ่อยในประเทศไทย สาเหตุที่แท้จริงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวนี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัด แต่เชื่อว่าถ้าได้รับรังสีหรือสารเคมีบางอย่างติดต่อกันเป็นระยะเวลานานก็จะเพิ่มอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดนี้ได้ และยังพบอีกว่ามะเร็งชนิดนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือโรคบางชนิดที่มีชิ้นของโครโมโซมที่ไม่เสถียร เช่น Down's syndrome, Fanconi's anemia, Bloom's syndrome, และ ataxia telangiectasia ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงใน oncogenes หรือ tumor suppressor genes ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดมะเร็งชนิดนี้ได้เช่นกัน เช่น การกลายพันธุ์ชนิด point mutation ของ ras oncogene, การเคลื่อนย้ายท่อนโครโมโซม (chromosome translocation) ของ abl, c-myc, E2A และ interleukin-3 oncogenes รวมทั้งการสูญเสียหน้าที่ของ p53 tumor suppressor gene เป็นต้น อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีผู้ศึกษาบทบาทของภาวะ pro-oxidants และ antioxidants ต่อการเกิดมะเร็ง พบว่าปฏิกิริยาไลปิดเปอร์ออกซิเดชั่นและระบบสารที่ต้านอนุมูลเสรีของอ็อกซิเจนก็มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการของการเกิดมะเร็ง ซึ่งการศึกษานี้ได้สร้างสมมติฐานของกลไกที่แตกต่างกัน 2 กลไก คือ 1) active oxygen species ที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นสาเหตุในการทำลายสารชีวโมเลกุล (biomolecules) ที่มีอยู่ภายในเซลล์ และ 2) มีการเปลี่ยนแปลงของระบบเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนโดยการปรับให้มีการทำงานมากขึ้น เพื่อช่วยให้เซลล์มะเร็งสามารถต้านความเป็นพิษของอนุมูลเสรีของออกซิเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้[24] ซึ่งจากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia ในคนไทยนี้ ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ในเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกับที่ได้เคยมีผู้ศึกษาไว้แล้ว[13,16,17] การที่ผู้วิจัยไม่ศึกษาในเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งโดยตรงนี้ เนื่องจากในภาวะปกติเม็ดเลือดขาวจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการผลิตอนุมูลเสรีของออกซิเจนผ่านทางกระบวนการที่เรียกว่า respiratory burst ดังนั้นในภาวะเช่นนี้เม็ดเลือดขาวจึงมีระบบป้องกันตนเองจากการมีอนุมูลเสรีของออกซิเจนสูง เช่น เอนไซม์ SOD จะมีปริมาณมาก ด้วยเหตุนี้เม็ดเลือดขาวอาจไม่ใช่ดัชนีที่ดีในการประเมินภาวะอ็อกซิเดทีฟสเตรสที่เกิดขึ้นในร่างกายของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว ในทางตรงข้ามเม็ดเลือดแดงซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย พบว่าประมาณ 3% ของออกซิเจนที่ถูกขนส่งโดยเม็ดเลือดแดงนี้จะเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลเสรีของออกซิเจนซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในเซลล์อื่นๆ ด้วยเหตุนี้เม็ดเลือดแดงจึงเป็นดัชนีที่ดีในการประเมินภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่เกิดขึ้นในร่างกาย [25-27] จากการศึกษานี้พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ในเม็ดเลือดแดงจะมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับระดับของ MDA ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมา ผลการศึกษานี้จึงสะท้อนให้เห็นถึงระบบต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนในผู้ป่วยที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลเสรีของออกซิเจนได้หมด ทำให้มีอนุมูลเสรีของออกซิเจนเหลือเพียงพอที่จะเล็ดลอดออกไปทำลายเซลล์อื่นได้ต่อไป ดังนั้นการศึกษานี้จึงไม่ได้สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าวเบื้องต้น แสดงว่าปฏิกิริยาไลปิดเปอร์ออกซิเดชั่นอาจไม่ใช่ปฏิกิริยาแรกของการเกิดเซลล์มะเร็ง และเมื่อศึกษาสหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวระหว่างการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมากับจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงเดียวของการทำงานของเอนไซม์ SOD และปริมาณของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมา กับจำนวนของมะเร็งเม็ดเลือดและปริมาณของ hemoglobin ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าระบบของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความบกพร่องนี้ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด ความบกพร่องของเอนไซม์นี้อาจจะมีสาเหตุมาจาก DNA ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนี้มีความอ่อนไหวต่อการถูกทำลายโดยระบบอนุมูลอิสระของออกซิเจน (DNA damage) ได้ง่ายกว่าคนปกติ จึงทำให้การสร้างเอนไซม์นี้มีปริมาณน้อยกว่าปกติ หรืออาจจะเกิดจากเอนไซม์ SOD ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีความไวต่อการถูกทำลายโดยอนุมูลเสรีของออกซิเจน ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้ลดต่ำลง เป็นสาเหตุให้อนุมูลเสรีของออกซิเจนไม่สามารถถูกกำจัดได้หมดโดยเอนไซม์นี้ ด้วยเหตุนี้ระดับของ MDA ทั้งในเม็ดเลือดแดงและพลาสมาจึงสูงกว่าคนปกติ และจากการศึกษาของ Punnonen และคณะ[28] พบว่าระดับของภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่เพิ่มสูงขึ้นนี้ มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งโดยการไปควบคุมการแสดงออกของ oncogenes และยังพบอีกว่า active oxygen species มีความสามารถในการควบคุมการทำงานของ protein kinase C ด้วย[29] ซึ่งโปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงและการแบ่งตัวของเซลล์ (cellular differentiation and proliferation) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดเซลล์มะเร็ง[30] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะมีภาวะออกซิเดทีฟสเตรสสูงกว่าคนปกติ และภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่สูงนี้อาจจะไปควบคุมการแสดงออกของยีน SOD ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาต่อไป

จากการศึกษานี้ จึงสรุปได้ว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphocytic leukemia มีระบบของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนบกพร่อง นั่นคือการทำงานของเอนไซม์ SOD มีระดับลดลง และมี MDA ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่กล่าวมาเบื้องต้น อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์ SOD นี้ก็ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในหลายรายงานดังที่กล่าวมาแล้วในบทนำ นั่นคือบางรายงานมีระดับการทำงานของเอนไซม์นี้เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่บางรายงานมีระดับการทำงานของเอนไซม์นี้ลดต่ำลง กลไกที่แท้จริงของการผันแปรนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาของ Ookawara และคณะ[31] พบว่าถ้าระดับอนุมูลเสรีของออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นก็จะไปออกซิไดส์เอนไซม์ SOD ทำให้เกิดการแตกหัก (fragmentation) ของเอนไซม์นี้ เป็นสาเหตุให้เอนไซม์นี้สูญเสียการทำหน้าที่ไป จึงอาจเป็นไปได้ว่าในระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว จำนวนอนุมูลเสรีของออกซิเจนจะมีจำนวนน้อย ซึ่งอนุมูลเสรีของออกซิเจนจำนวนน้อยนี้จะไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวสร้างเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น เพื่อป้องกันตนเองจากภาวะออกซิเดทีฟสเตรสนี้[32] และเมื่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีจำนวนมากขึ้น จำนวนอนุมูลเสรีของออกซิเจนก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นด้วย ปริมาณอนุมูลเสรีของออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้นนี้อาจจะไปออกซิไดส์เอนไซม์ SOD เป็นสาเหตุให้การทำงานของเอนไซม์ลดต่ำลง[31,33] นอกจากนี้ยังอาจไปควบคุมการแสดงออกของยีน SOD ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ด้วยเหตุนี้การศึกษาภาวะออกซิเดทีฟสเตรสต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในระยะต่างๆ ของการเกิดโรคอาจจะอธิบายกลไกที่แท้จริงของการทำงานของเอนไซม์ SOD ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ ดังนั้นบนพื้นฐานของความรู้ในปัจจุบันจึงอาจกล่าวได้ว่าปฏิกิริยาไลปิดเปอร์-ออกซิเดชั่น และระบบของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลเสรีของออกซิเจนอาจจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงในการสับเปลี่ยนไขมันที่ผนังเซลล์ (membrane lipid turn over) หรืออาจกล่าวได้ว่าผลที่ตามมาของการสับเปลี่ยนไขมันที่ผนังเซลล์นี้ อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์โดยผ่านการทำงานของ protein kinase C ก็เป็นได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และ ศ.พญ.อนงค์ เพียรกิจกรรม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านการจัดเตรียมผู้ป่วย รวมทั้งการให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณปรีชา ใจเจริญ ที่ได้ช่วยเหลือด้านเทคนิคของการวิเคราะห์ทางชีวเคมี จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Shoji Y, Uedono Y, Ishikura H, Takeyama N, Tanaka T. DNA damage induced by tumor necrosis factor-α in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. Immunology 1995; **84**: 543-48.
2. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. Cancer Res 1976; **3**: 2326-29.
3. Doreshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. Proc Natl Acad Sci USA 1986; **78**: 4514-18.
4. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer : a reveiw. Cancer Res 1979; **39**: 1141-49.
5. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues . Cancer Res 1982; **42**: 1955-61.
6. Tisdale MJ, Mahmoud MB. Activities of free radical metabolizing enzymes in tumors. Br J Cancer 1983; **47**: 809-12.
7. Franco ME, Carrillo MDC, Hernandez C, et al. Erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with malignant neoplasm. Arch Invest Med 1990; **21**: 285-88.
8. Punnonen R, Kudo R, Punnonen K, et al. Activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrial cancer. Eur J Cancer 1993; **29A**: 266-63.
9. Zima T, Spicka I, Stipek S, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with multiple myeloma. Neoplasm 1996; **43**: 69-73.
10. Melloni B, Lefebvre MA, Bonnaud F, et al. Antioxidant acitivity in bronchoalveolar larvage fluid from patients with lung cancer. Am J Resp Crit Care Med 1996; **154**: 1706-11.
11. Yamanaka N, Nishida K, Ota K. Increase of superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. Physiol Chem Physics 1979; **11**: 253-59.
12. Kokoglu E, Aktaglu G. Belce A. Leukocyte superoxide dismutase levels in acute and chronic leukemias. Leuk Res 1989; **13**: 457-8.
13. Stoklasova A, Randova Z, Radochova D. Erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with pernicious anemia and chronic lymphocytic leukemia. Shor Ved Praci Lek Fax Karlovy University Hradci Kralove 1990; **33**: 501-5.
14. Abdel-Aziz AF, El-Naggaar MM. Superoxide dismutase activities in serum and white blood cells of patients with some malignancies. Cancer Lett 1997; **113**: 61-4.
15. Yoshimitsu K, Kobayashi Y, Usui T. Superoxide dismutase activity in leukemia blasts of children with acute leukemia. Acta Paediatr Scand 1984; **73**: 92-6.
16. Saito T. Superoxide dismutase level in human erythrocytes and its clinical application to the patients with cancers and thyroidal dysfunctions. Hokkaido J Med Sci 1987; **62**: 257-68.
17. Arruda VR, Salles TS, Costa FF, Saad ST. Glutathione peroxidase, reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase in red cells of patients with hairy cell leukemia. Neoplasm 1996; **43**: 99-102.
18. Sun Y. Free radicals and antioxidant enzymes and carcinogenesis. Free Rad Biol Med 1990; **8**: 583-99.
19. van Poppel G, van den Berg H. Vitamins and cancer.

Cancer Lett 1997; 114: 195-202.

20. Beutler E, West C, Blume KB. The remove of leukocyte and platelet from whole blood. J Lab Clin Med 1976; 88: 328-33.
21. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med 1975; 85: 337-41.
22. Cynamon HA, Nevin Isenberg J, Nguyen CH. Erythrocyte malondialdehyde release in vitro : a functional measure of vitamin E status. Clin Chem Acta 1985; 151: 169-76.
23. McCusker CA, Lamont JV, Fitzgerald SP. Total antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic patients. 7th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, 1995: 104.
24. Punnonen K, Ahotupa M, Asaishi K, et al. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120: 374-7.
25. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; 20: 875-80.
26. Duthie GG, Roberson JD, Maughan RJ, et al. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. Arch Biochem Biophys 1990; 282: 78-83.
27. Salin ML, McCord JM. Superoxide dismutase in polymorphonuclear leukocytes. J Clin Invest 1974; 54: 1005-9.
28. Punnonen K, Puntala A, Jansen CT, Ahotupa M. Effects of in vivo PUFA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. J Invest Dermatol 1991; 96: 255-9.
29. Cerutti CA. Prooxidant states and tumor promotion. Science 1985; 227: 375-80.
30. Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca^{2+} and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6758-22.
31. Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, et al. Site specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. J Biol Chem 1992; 267: 18505-10.
32. Evelo CT, Palmen NG, Arthur Y, et al. Changes in blood glutathione concentration, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. Eur J Appl Physiol 1992; 64: 354-58.
33. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxide and derived free radicals. Mech Ageing Devel 1990; 51: 283-97.