การลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น อาศัยกลไกผ่านทางการลดลงของเอสอะดีโนซิลเมไทโอนีน

นายจิรพัฒน์ คล้อยปาน

2071921265

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5574198730

LINE-1 HYPOMETHYLATION INDUCED BY OXIDATIVE STRESS IN BLADDER CANCER CELLS IS MEDIATED VIA DEPLETION OF S-ADENOSYLMETHIONINE

Mr. Chiraphat Kloypan

2071921265

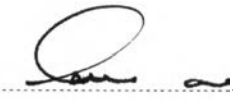
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

560978

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น อาศัยกลไกผ่านทางการลดลงของเอสอะดีโนซิลเมไทโอนีน
โดย	นายจิรพัฒน์ คล้อยปาน
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

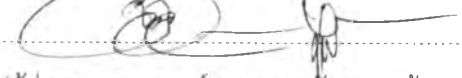
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

2071921265

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

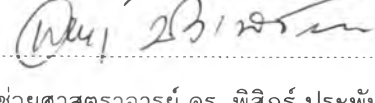
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

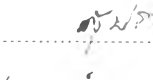
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)



.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)



.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. สุปรานี กองคำ)

จิรพัฒน์ คล้อยปาน : การลดลงของระดับเมทิลเลชั่นของ LINE-1 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น อาศัยกลไกผ่านทางการลดลงของเอสอะดีโนซิลเมไทโอนีน. (LINE-1 HYPOMETHYLATION INDUCED BY OXIDATIVE STRESS IN BLADDER CANCER CELLS IS MEDIATED VIA DEPLETION OF S-ADENOSYLMETHIONINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชาญชัย บุญหล้า, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ. ดร. มนพิชา ศรีสะอาด, 77 หน้า.

เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเหนือพันธุกรรม เป็นกลไกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ก่อนหน้านี้ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและการเกิด LINE-1 hypomethylation ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและคนปกติสุขภาพดี และพบว่า reactive oxygen species (ROS) ชักนำให้เกิด LINE-1 hypomethylation ได้ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในเซลล์เยื่อบุผิวท่อไต (HK-2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 2 ชนิด ได้แก่ UM-UC-3 และ TCCSUP เพื่อพิสูจน์ว่า LINE-1 hypomethylation ที่ชักนำโดยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น เป็นผลมาจากการลดต่ำลงของ S-adenosylmethionine (SAM) ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย 20 μM H_2O_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ แต่ส่งผลให้มีระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์และปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์สูงขึ้น ผลการวัดระดับ LINE-1 methylation ด้วยเทคนิค combined bisulfite restriction analysis PCR พบว่า H_2O_2 สามารถทำให้เกิด LINE-1 hypomethylation ใน UM-UC-3 และ TCCSUP cell ตามระยะเวลาที่สัมผัส และพบว่า LINE-1 hypomethylation ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถูกยับยั้งได้ด้วย α-tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), methionine, SAM และ folic acid ระดับ SAM ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่พบการเพิ่มขึ้นของ total glutathione โดยการลดลงของ SAM ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 สามารถกลับคืนสู่ระดับปกติได้ด้วยการให้ NAC, methionine, SAM และ folic acid ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione สามารถกลับคืนสู่ระดับปกติได้ด้วยการให้ TA และ NAC นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังพบการลดลงของระดับ homocysteine (Hcy) ในเซลล์ HK-2 และ TCCSUP ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ซึ่งการให้ NAC สามารถยับยั้งการลดลงของ Hcy ได้ สรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 มีการลดลงของระดับ SAM และ Hcy ในขณะที่มีการเพิ่มระดับ total glutathione โดยลักษณะดังกล่าวสามารถทำให้กลับคืนสู่ภาวะปกติได้ด้วยสารด้านอนุมูลอิสระและการให้สารตัวกลางใน one-carbon metabolism ดังนั้น กลไกการเกิด LINE-1 hypomethylation ในภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น น่าจะเกิดจากการเพิ่มการสังเคราะห์ glutathione ผ่านวิถี transsulfuration ซึ่งมีการใช้ Hcy สำหรับสร้างเป็น cysteine ส่งผลให้เกิดการพร่อง Hcy ซึ่งสุดท้ายส่งผลให้เกิดการพร่อง SAM และเกิด LINE-1 hypomethylation

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

2071921265

5574198730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY
KEYWORDS: BLADDER CANCER / DNA METHYLATION / LINE-1 / OXIDATIVE STRESS / S-ADENOSYLMETHIONINE

CHIRAPHAT KLOYPAN: LINE-1 HYPOMETHYLATION INDUCED BY OXIDATIVE STRESS IN BLADDER CANCER CELLS IS MEDIATED VIA DEPLETION OF S-ADENOSYLMETHIONINE. ADVISOR: ASST. PROF. CHANCHAI BOONLA, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D.,Ph.D, MONPICHAR SRISA-ART, 77 pp.

Oxidative stress and epigenetic change are well known processes involved in the carcinogenesis. We previously reported a relationship between oxidative stress and hypomethylation of long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1) both in bladder cancer patients and healthy subjects. We also demonstrated that LINE-1 hypomethylation was induced by reactive oxygen species (ROS) in bladder cancer cell line. However the mechanism of ROS-induced LINE-1 hypomethylation is unknown. In this study, we investigated in a normal human kidney cell line (HK-2) and two bladder cancer cell lines (UM-UC-3 and TCCSUP) whether the ROS-induced LINE-1 hypomethylation was mediated via the depletion of methyl donor, S-adenosylmethionine (SAM). Cells exposed to 20 μM H_2O_2 for 24, 48 and 72 hr caused no significant change of cell viability, but increases in intracellular ROS production and protein carbonyl content. LINE-1 methylation level was measured by combined bisulfite restriction analysis PCR. H_2O_2 was capable of inducing LINE-1 hypomethylation in UM-UC-3 and TCCSUP cells in time-dependent manner. At 72 hr, LINE-1 hypomethylation was observed in the H_2O_2-treated cells, and the hypomethylation was reversed by α-tocopheryl acetate (TA), N-acetylcysteine (NAC), methionine, SAM and folic acid. SAM was significantly decreased, while total glutathione was increased in the H_2O_2-treated cells. The depleted level of SAM in H_2O_2-treated cells was restored by NAC, methionine, SAM and folic acid, whereas the elevated total glutathione was normalized by TA and NAC. We also demonstrated a significant decrease in homocysteine level in HK-2 and TCCSUP cells treated with H_2O_2, and this phenomenon was reversed by NAC. Conclusion, we demonstrated that SAM and homocysteine were depleted, while total glutathione was raised, in cells exposed to H_2O_2, and these changes were restored by antioxidants (TA and NAC) and metabolites in one-carbon metabolism pathway (SAM, methionine and folic acid). Our findings suggest that exposure of cells to ROS induces glutathione synthesis via transsulfuration pathway, by which homocysteine is used to synthesize cysteine, leading to deficiency of homocysteine. This subsequently causes depletion of SAM and eventually hypomethylation of LINE-1.

2071921265

Department: Biochemistry
Field of Study: Medical Biochemistry
Academic Year: 2013

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโทชีวเคมีทางการแพทย์ ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการศึกษา ที่ช่วยเหลือดูแล เอาใจใส่ชีวิตความเป็นอยู่ ตลอดจนคำแนะนำ ในการรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม และการนำเสนอ และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และอาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อแนะนำที่มีประโยชน์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่ยินดีเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ และอาจารย์ ดร. สุปรานี กองคำ อาจารย์ประจำสาขาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเมตตา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และอบรมสั่งสอนคุณธรรม จริยธรรม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณกาญจนา เคาวสุต คุณจำรัส มณี และคุณสนาน ละมาตร์ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้านการติดต่อประสานงาน ร่วมถึงออกหนังสือต่างๆในการสอบโครงร่างและการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อบรมสั่งสอนและปลูกผังจิตสำนึกและทัศนคติที่ดีต่อการเรียนและการเผชิญกับปัญหาหนัก รวมถึงการอนุมัติการลาศึกษาต่อในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์พิเศษ ภก.ดร.มณฑล สงวนเสริมศรี อธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยา อาจารย์ ดร. สำราญ ทองแพงและกองทุนพัฒนาอาจารย์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อุปการะค่าเล่าเรียน ตลอดจนค่าใช้จ่ายรายเดือนขณะศึกษาต่อ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ (ร.ต.ต. สำเร็จ คล้อยปาน) และคุณแม่ (จิราภรณ์ คล้อยปาน) ที่เป็นผู้อุปการะทุกๆด้าน ขอบขอบคุณที่ส่งเสียเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ขอบคุณกำลังใจที่มองให้ในยามเหนื่อยและท้อแท้ ขอขอบคุณญาติ พี่ น้อง เพื่อนๆทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นัฐธิญา กาลพงษ์นุกูล ที่อยู่เคียงข้างและคอยให้กำลังใจเสมอมา

2071921285

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ 3

ขอบเขตและรูปแบบการวิจัย 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

คำสำคัญ 4

ข้อตกลงเบื้องต้น 4

ข้อจำกัดในงานวิจัย 5

คำนิยามเชิงปฏิบัติการ 5

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม 6

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20

เซลล์เพาะเลี้ยง 20

สถานที่ทำวิจัย 20

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 20

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ 23

การเก็บข้อมูล 33

การวิเคราะห์ข้อมูล 33

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 36

ผลของ H_2O_2 ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 36

2071921265

หน้า

ผลของ α-tocopheryl acetate ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 40
ผลของ N-acetylcysteine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 41
ผลของ Methionine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 42
ผลของ S-adenosylmethionine ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 43
ผลของ Folic acid ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง 44
ผลของ H_2O_2 ต่อการเกิด ROS ภายในเซลล์ 45
ผลของ H_2O_2 ต่อระดับโปรตีนคาร์บอนิลภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนคาร์บอนิล 46
ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ตามระยะเวลา 48
ผลของ H_2O_2 และสารต้านอนุมูลอิสระต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation 49
ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูตาไทโอนภายในเซลล์ 51
ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ SAM และ SAH 54
ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Hcy 57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 58
สรุปผลการทดลอง 58
อภิปรายผลการทดลอง 59
ข้อเสนอแนะ 63
รายการอ้างอิง 64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 77

2071921265

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัย 20
ตาราง 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 21

2071921265

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงกลไกปฏิกิริยา DNA methylation 8
ภาพที่ 2 แสดงปฏิกิริยา DNA methylation 9
ภาพที่ 3 แสดงองค์ประกอบของ human genome 10
ภาพที่ 4 แสดงส่วนประกอบของ Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1 or L1) 11
ภาพที่ 5 แสดงวิถี one-carbon metabolism และ transsuluration 13
ภาพที่ 6 แสดงปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยปฏิกิริยา one-electron reduction of molecular oxygen และ Fenton reaction 14
ภาพที่ 7 แสดงภาพรวมของ ROS ต่อการเกิดมะเร็ง 15
ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของกลูตาไธโอน 16
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ α-tocopherol และกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ 17
ภาพที่ 10 แสดงหลักการ MTT reduction test 24
ภาพที่ 11 แสดงการทำปฏิกิริยา bisulfite conversion 26
ภาพที่ 12 แสดงหลักการวัดระดับการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค COBRA LINE-1 27
ภาพที่ 13 แสดงภาวะต่างๆสำหรับการทำ LINE-1 PCR 28
ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ COBRA-LINE-1 โดยวิธี PAGE 28
ภาพที่ 15 แสดงหลักการการวัดโปรตีนคาร์บอนิลด้วยวิธี DNPH assay 30
ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของ GSH standard 31
ภาพที่ 17 ตัวอย่าง chromatogram ของ SAM และ SAH standard และสารตัวอย่าง 34
ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐานของ SAM standard 35
ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานของ SAH standard 35
ภาพที่ 20 ความเป็นพิษของ H_2O_2 เมื่อเซลล์สัมผัส H_2O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 37
ภาพที่ 21 ความเป็นพิษของ H_2O_2 เมื่อเซลล์สัมผัส H_2O_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 38
ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของ H_2O_2 เมื่อเซลล์สัมผัส H_2O_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 39
ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของ α-tocopheryl acetate 40
ภาพที่ 24 ความเป็นพิษของ N-acetylcysteine 41
ภาพที่ 25 ความเป็นพิษของ Methionine 42
ภาพที่ 26 ความเป็นพิษของ S-adenosylmethionine 43
ภาพที่ 27 ความเป็นพิษของ Folic acid 44
ภาพที่ 28 ระดับการสร้าง ROS 45
ภาพที่ 29 แสดงระดับโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ 47

2071921265

หน้า

ภาพที่ 30 แสดงร้อยละการเติมหมู่เมทิลที่ LINE-1 ตามระยะเวลาที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น 48
ภาพที่ 31 แสดงระดับ LINE-1 methylation ภายใต้ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและผลของสารต้านอนุมูลอิสระและการขดเขยสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation 50
ภาพที่ 32 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione และ reduced glutathione ใน HK-2 cell 51
ภาพที่ 33 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione และ reduced glutathione ใน UM-UC-3 cell 52
ภาพที่ 34 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นและสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ total glutathione และ reduced glutathione ใน TCCSUP cell 53
ภาพที่ 35 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAM ในเซลล์ 55
ภาพที่ 36 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น สารต้านอนุมูลอิสระ และสารตัวกลางในวิถี one-carbon metabolism ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SAH ในเซลล์ 56
ภาพที่ 37 แสดงผลของภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hcy ใน HK-2 cell และ TCCSUP 57

2071921265