

Executive Summary

1. หลักการและเหตุผล

สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นหน่วยงานสนับสนุนและส่งเสริมการวิจัย และดำเนินการวิจัยเองเพื่อให้สถานส่งเสริมการวิจัยเป็นหน่วยงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชั้นเลิศเทียบเท่าระดับสากล โดยมีพันธกิจในการพัฒนาบุคลากรของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลให้มีความรู้และทักษะการทำวิจัย โดยให้การสนับสนุนและส่งเสริมการวิจัยของบุคลากรทั้งภายในและภายนอกคณะฯ ตลอดจนการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ในปัจจุบันสถานส่งเสริมการวิจัยมีโครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ยังมีอุปสรรคในเรื่องงบประมาณสนับสนุนการดำเนินการวิจัยทางด้านบุคลากร วัสดุสารเคมี และค่าใช้สอยอื่นๆ ซึ่งมีงบค่อนข้างจำกัดไม่สอดคล้องกับจำนวนโครงการวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลงานวิจัยยังไม่มีประสิทธิภาพสูงสุด รวมทั้งยังเป็นปัจจัยหลักที่เป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการก้าวไปสู่การเป็น Center of Excellence ได้ในอนาคต ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับการพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศ สถานส่งเสริมการวิจัยจึงขอสมัครรับทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบันด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลจะร่วมสนับสนุนด้วยงบประมาณเท่ากับงบประมาณสนับสนุนจาก สกว. เพื่อพัฒนางานวิจัยของสถานส่งเสริมการวิจัย ภายใต้คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

2. วัตถุประสงค์

เพื่อเพิ่มศักยภาพการทำวิจัยของสถานส่งเสริมการวิจัย ภายใต้คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ทั้งในเชิงปริมาณ (โดยดูจากจำนวนผลงานตีพิมพ์ทั้งหมดต่อปีที่เพิ่มขึ้น) และเชิงคุณภาพ (โดยดูจากการมี Impact Factor รวมต่อปี, Impact Factor เฉลี่ยต่อเรื่อง, ร้อยละของผลงานที่อยู่ใน Q1/Q2 และ citations per publication ที่เพิ่มขึ้น) เพื่อก่อให้เกิดการพัฒนา รวมถึงการยกระดับงานวิจัยพร้อมทั้งมีการผลักดันเพื่อจัดตั้งให้หน่วยงานภายใต้สถานส่งเสริมการวิจัยเป็น Center of Excellence ภายในคณะฯ ได้ในอนาคต

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 Molecular Medicine Research

- 3.1.1 ศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไตในครอบครัวคนไทย ด้วยเทคนิค exome sequencing และศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกลไกการเกิดโรคนี้ด้วยเทคนิคทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยา
- 3.1.2 ศึกษาพันธุกรรมและยีนที่เกี่ยวข้องในผู้ป่วยที่เป็น Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) ด้วยเทคนิค exome sequencing พร้อมทั้งศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2
- 3.1.3 พัฒนาเทคนิคการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ที ลิมโฟซัยต์ (T lymphocyte) ซึ่งมีตัวรับแบบลูกผสม (Chimeric Antigen Receptor T cells; CAR-T cells) ให้มีความสามารถในการจดจำและทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะ โดยจะใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวและมะเร็งท่อน้ำดีเป็นต้นแบบในการพัฒนา และจะขยายเทคนิคดังกล่าวในโรคมะเร็งชนิดอื่นๆด้วย เช่น มะเร็งตับ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เป็นต้น

3.2 Medical Proteomics Research

- 3.2.1 ศึกษาภาพรวมของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่างๆของโรค เช่น โรคนี้ไต โรคพังผืดในไต และโรคอื่นๆ โดยการใช้เทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์ เพื่อนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้โรค (biomarkers) ที่ดีได้

- 3.2.2 ศึกษาการทำงานของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่างๆ ของโรค ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบกลไกและปัจจัยสำคัญที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค ทั้งนี้ยังสามารถนำความรู้ความเข้าใจที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาแนวทางการรักษาและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

3.3 Dengue Hemorrhagic Fever Research

- 3.3.1 การค้นหาลำดับของโปรตีน capsid ที่สำคัญที่สุดต่อการสร้างอนุภาคของเชื้อไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ติดเชื้อมาได้
- 3.3.2 ศึกษาคุณสมบัติและการตอบสนองของเซลล์ตับที่พัฒนามาจากการกระตุ้นสเต็มเซลล์ให้เกิด Differentiation เป็นเซลล์ตับมนุษย์ (hepatocyte-like cells, HLC) ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ เพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับการศึกษากลไกการก่อโรคของไวรัสเด็งกี่ในหลอดทดลอง
- 3.3.3 ศึกษาหาโปรตีนของมนุษย์ที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเด็งกี่ และทำให้ไวรัสเด็งกี่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้อมาได้ เพื่อเป็นแนวทางในการหายาด้านไวรัส พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ของยาต้านไวรัสที่มีการใช้อยู่แล้วในคนไข้โรคอื่นๆ

3.4 Malarial Research

- 3.4.1 ศึกษาผลของพลาสมาหรือซีรัมของผู้ป่วยที่มีต่อการติดเชื้อมาลาเรียของเม็ดเลือดแดง และศึกษาผลของสารน้ำ (supernatant และ microparticles) และสารประกอบโปรตีนชนิดต่างๆ ในพลาสมาหรือซีรัมของผู้ป่วย ที่มีอิทธิพลต่อการติดเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง

3.5 Stem Cell Research

- 3.5.1 สร้าง induced pluripotent stem cells (iPSCs) จากเซลล์ผิวหนังของคนปกติ และพัฒนาให้กลายเป็น T lymphocytes สำหรับศึกษาความเป็นไปได้ของการสร้าง iPSCs จากเซลล์ผิวหนังของผู้ป่วยโรคติดเชื้อ หรือโรคมะเร็ง

3.6 Bioinformatics and Data Management for Research

- 3.6.1 สร้างการทำงานแบบสายท่อ (pipeline) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมากที่ได้จากเทคโนโลยีการหาลำดับเบสแบบใหม่ (next-generation sequencing) โดยในแผนงานที่วางเอาไว้มีทั้งหมดสาม pipelines สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสระดับ exome genome และ mitochondrial genome
- 3.6.2 เพิ่มขีดความสามารถในการประมวลผลและปฏิบัติงานของระบบชีวสารสนเทศ และนำมาใช้ร่วมกับ pipeline ที่สร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเฉพาะข้อมูลจากโครงการต่างๆ ในองค์กร ที่ได้มีการหาลำดับเบสไว้แล้วแต่ยังขาดผู้วิเคราะห์ข้อมูล
- 3.6.3 เผยแพร่ความรู้และ pipeline ที่ได้สู่กลุ่มวิจัยต่างๆ ที่มีข้อมูลลำดับเบสจำนวนมากอยู่แล้วหรือวางแผนที่จะทำการหาลำดับเบสในอนาคต ทั้งภายในและภายนอกองค์กร

4. ผลการดำเนินงาน

- แต่ละโครงการย่อยสามารถทำตามแผนงานเป้าหมายได้สำเร็จ

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 สามารถเพิ่มศักยภาพการวิจัยของสถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ให้สูงขึ้นทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของงานวิจัย ให้มีระดับทัดเทียมกับนานาชาติ ดังรายละเอียดที่ชี้แจงในเป้าหมาย (ข้อ 6)
- 5.2 ก่อให้เกิดความร่วมมือในการวิจัยของหน่วยงานต่างๆ ทั้งปริทัศน์และคลินิก ภายในคณะฯ ที่ยั่งยืนต่อไป

- 5.3 สามารถพัฒนานักวิจัยและบุคลากรให้มีศักยภาพเพิ่มมากขึ้น เพื่อส่งเสริมให้เกิด Center of Excellence ภายในคณะฯ
- 5.4 ผลที่ได้จะเป็นกลไกหนึ่งที่สนับสนุนให้ Ranking ในระดับนานาชาติของสถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และมหาวิทยาลัยมหิดล ดีขึ้น

6. ผลงานตีพิมพ์เป็นบทความในวารสารวิชาการนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล Web of Sciences (ISI)

6.1 เชิงปริมาณ

6.1.1	มีจำนวนผลงานตีพิมพ์ทั้งหมดต่อปีเพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 47.33 เรื่อง/ปี)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	86	เรื่อง/ปี
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	75	เรื่อง/ปี
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	70	เรื่อง/ปี
	รวม 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	231	เรื่อง/สามปี
(หรือ) 6.1.2	มีจำนวนผลงานตีพิมพ์ต่อจำนวนอาจารย์เพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 2.06 เรื่อง/คน/ปี)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	3.58	เรื่อง/คน/ปี
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	2.88	เรื่อง/คน/ปี
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	2.69	เรื่อง/คน/ปี
	เฉลี่ย 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	3.05	เรื่อง/คน/ปี
(หรือ) 6.1.3	มีจำนวนผลงานตีพิมพ์ต่อจำนวนอาจารย์และนักวิจัยเพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 1.48 เรื่อง/คน/ปี)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	2.39	เรื่อง/คน/ปี
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	2.03	เรื่อง/คน/ปี
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	1.80	เรื่อง/คน/ปี
	เฉลี่ย 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	2.07	เรื่อง/คน/ปี

(และ) 6.2 เชิงคุณภาพ

6.2.1	มี Impact Factor รวมต่อปีเพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 162.58 ต่อปี)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	378.17	ต่อปี
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	358.55	ต่อปี
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	274.64	ต่อปี
	รวม 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	1,011.36	ต่อสามปี
(หรือ) 6.2.2	มี Impact Factor เฉลี่ยต่อเรื่องเพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 3.43 ต่อเรื่อง)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	4.39	ต่อเรื่อง
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	4.78	ต่อเรื่อง
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	3.92	ต่อเรื่อง
	เฉลี่ย 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	4.36	ต่อเรื่อง
(หรือ) 6.2.3	มีผลงานที่อยู่ใน Q1/Q2 เพิ่มขึ้นจากปี 2556 – 2558 (เฉลี่ย 78% ของผลงานในแต่ละปี)		
	ปี 2559 เพิ่มขึ้น	86.0	% ของผลงานในแต่ละปี
	ปี 2560 เพิ่มขึ้น	66.7	% ของผลงานในแต่ละปี
	ปี 2561 เพิ่มขึ้น	74.3	% ของผลงานในแต่ละปี
	เฉลี่ย 3 ปี (2559 – 2561) เพิ่มขึ้น	76.2	% ของผลงานทั้งสามปี

7. สรุปจำนวนบุคลากร (อาจารย์และนักวิจัย) และจำนวนผลงานตีพิมพ์เป็นบทความในวารสารวิชาการนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล Web of Sciences (ISI) ที่ทำได้จริงเปรียบเทียบกับที่คาดการณ์ไว้ ดังตารางด้านล่าง

	2559		2560		2561		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย
	คาดการณ์	ทำได้จริง	คาดการณ์	ทำได้จริง	คาดการณ์	ทำได้จริง	ก่อนได้รับทุน	หลังได้รับทุน
จำนวนผลงานตีพิมพ์	52	86	56	75	58	70	47	77
จำนวนอาจารย์และนักวิจัย	34	36	34	37	34	39	31.67	37.33
จำนวนผลงานใน Q1+Q2	41	74	46	50	49	52	37	58.67
จำนวนผลงานใน Q1-4	52	86	56	75	58	70	47.33	77
(จำนวนผลงานใน Q1+Q2)/จำนวนบุคลากร	1.21	2.06	1.35	1.35	1.44	1.33	1.17	1.58
(จำนวนผลงานใน Q1+Q2)/(จำนวนผลงานใน Q1-4)	0.79	0.86	0.82	0.67	0.84	0.74	0.78	0.76

ทั้งข้อมูลจำนวนผลงาน และสัดส่วนผลงานที่คาดการณ์เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10% เทียบกับก่อนรับทุน

8. ภาควิชา/สาขาวิชาที่เสนอให้มีการทำ Benchmarking

- สามารถผลิตผลงานวิจัยได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Department of Microbiology and Immunology, National Cheng Kung University, Taiwan ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ

สรุปผลการดำเนินการ

Molecular Medicine Research

1. โครงการวิจัยภูมิคุ้มกันบำบัดโรคมะเร็ง

1.1. การใช้เอ็ม-อาร์เอ็นเอเพื่อกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้เอ็ม-อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงกระตุ้นเซลล์เดนไดรติก และทดสอบการพัฒนาสู่ภาวะเติบโตเต็มวัยของเซลล์เดนไดรติก
2. เพื่อใช้เซลล์เดนไดรติกที่ได้กระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ให้จดจำแอนติเจนของเซลล์มะเร็ง และทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของเซลล์ลิมโฟไซต์

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้นำเอ็ม-อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง จำนวน 3 ชนิด คือ KKU-100, KKU-M055 และ KKU-M213 มาใส่ในเซลล์เดนไดรติก โดยใช้เอ็ม-อาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงหนึ่งชนิดหรือรวมกันสองชนิดหรือสามชนิด และทดสอบการพัฒนาสู่ภาวะเติบโตเต็มวัยของเซลล์เดนไดรติกด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมตรี และนำเซลล์เดนไดรติกดังกล่าวไปกระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟไซต์ เพื่อให้จดจำแอนติเจนของเซลล์มะเร็ง และทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีตรวจการตายแบบอะพอพโทซิส ผลการศึกษาพบว่าการใช้เอ็ม-อาร์เอ็นเอจากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่หลากหลายนี้ ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญสู่ภาวะเติบโตเต็มวัยของเซลล์เดนไดรติก และยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ลิมโฟไซต์ให้กำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นถึงประมาณสองเท่า เมื่อเทียบกับการใช้เอ็ม-อาร์เอ็นเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงเพียงชนิดเดียวเพื่อเป็นแอนติเจน การศึกษานี้สรุปได้ว่าการเพิ่มความหลากหลายของแอนติเจนสามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการจดจำและกำจัดเซลล์มะเร็งได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลการดำเนินงาน

1. สามารถกระตุ้นและทดสอบการพัฒนาสู่ภาวะเติบโตเต็มวัยของเซลล์เดนไดรติก
2. สามารถทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของเซลล์ลิมโฟไซต์

1.2. การเพิ่มความสามารถของเซลล์ภูมิคุ้มกันในการกำจัดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการยับยั้งตัวรับสัญญาณของอินเตอร์ลิวคิน-เทन และทีจีเอฟ-เบต้า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกโปรตีนเป้าหมายเพื่อนำมาสร้าง สร้าง tricistronic lentivirus vector คือ LV-Smart/(Tumor associated antigen)
2. เพื่อผลิตเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะ (Smart DCs)
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะ

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้ทำการปรับปรุงการทำงานของเซลล์เดนไดรติกให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยการยับยั้งตัวรับที่จำเพาะของอินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า บนผิวเซลล์เดนไดรติก และทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ ชนิดไซโตทอกซิกที-เซลล์ ในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหลังจากกระตุ้นด้วยเซลล์เดนไดรติกที่ถูกยับยั้งตัวรับดังกล่าวบนผิวเซลล์ ผู้วิจัยศึกษาผลของการยับยั้งการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยทดสอบกับเซลล์เดนไดรติกที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ โดยใช้รีคอมบิแนนท์ไซโตไคน์ (จีเอ็ม-ซีเอสเอฟ และอินเตอร์ลิวคิน-1 α) เพื่อกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ ให้เจริญเป็นเซลล์เดนไดรติก จากผลการศึกษาพบว่า เซลล์เดนไดรติกของมนุษย์ มีการแสดงออกของตัวรับที่จำเพาะต่ออินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ทั้งในระดับเอ็ม-อาร์เอ็นเอและโปรตีนบนผิวเซลล์ นอกจากนี้

ยังสามารถตรวจพบโปรตีนอินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ในน้ำเลี้ยงของเซลล์เดนดริติกและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ตามลำดับ เมื่อยับยั้งตัวรับที่จำเพาะของอินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า บนผิวเซลล์เดนดริติก พบว่าสามารถเพิ่มระดับไซโตไคน์ อินเตอร์เฟอรอน-แกมมา จากเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ และกระตุ้นความสามารถของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดไซโตทอกซิกที-เซลล์ ในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า การยับยั้งตัวรับจำเพาะต่อไซโตไคน์เหล่านี้ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังผลิตเซลล์เดนดริติกจากเซลล์โมโนไซต์ ด้วยวิธีการทำทรานดักชันด้วยเลนติไวรัสที่มียีนจีเอ็ม-ซีเอสเอฟ และอินเตอร์ลิวคิน-โฟร์ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เดนดริติก เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการผลิตเซลล์เดนดริติก หลังจากนั้น จึงยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านตัวรับจำเพาะต่อไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ด้วยการทำทรานดักชันด้วยเลนติไวรัสที่มีเอสแซ-อาร์เอ็นเอ ซึ่งจะทำลายเอ็ม-อาร์เอ็นเอของตัวรับที่จำเพาะต่อไซโตไคน์ทั้งสองดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เดนดริติกที่ผลิตด้วยเลนติไวรัส มีการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเป็นต่อการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ เช่นเดียวกับเซลล์เดนดริติกที่เจริญมาจากการใช้รีคอมบิแนนท์ไซโตไคน์ นอกจากนี้ยังพบว่า การยับยั้งตัวรับที่จำเพาะต่อไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ด้วยเอสแซ-อาร์เอ็นเอที่จำเพาะในเซลล์เดนดริติกที่เตรียมด้วยวิธีนี้ สามารถกระตุ้นเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ให้หลังไซโตไคน์อินเตอร์เฟอรอน-แกมมาได้เพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดไซโตทอกซิกที-เซลล์ ในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการยับยั้งตัวรับจำเพาะต่อไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า ในเซลล์เดนดริติก จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์เดนดริติก จึงแนะนำให้ใช้ในการเตรียมเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ สำหรับการรักษาด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดด้วยการให้ที-เซลล์

ผลการดำเนินงาน

1. สามารถคัดเลือกโปรตีนเป้าหมายคือโปรตีน อินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า และนำมาสร้าง tricistronic lentivirus vector
 2. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะได้ โดยการยับยั้งตัวรับสัญญาณของอินเตอร์ลิวคิน-เทน และทีจีเอฟ-เบต้า
- 1.3. การผลิตเซลล์ภูมิคุ้มกันเดินไตริตติที่สามารถโปรแกรมตัวเอง (เซลล์เดินไตริตติอัจฉริยะ) เพื่อดำเนินการเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกโปรตีนเป้าหมายเพื่อนำมาสร้าง tricistronic lentivirus vector คือ LV-Smart/(Tumor associated antigen)
2. ผลิตเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะ (Smart DCs)
3. ทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะ
4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ effector T cell ที่กระตุ้นจากเซลล์ภูมิคุ้มกันอัจฉริยะในการทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เมื่อมีการนำมาใช้ร่วมกับเคมียาบำบัด gemcitabine

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการรักษาแบบทางเลือกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางการรักษานอกเหนือจากการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน โดยได้เลือกโปรตีน Protein kinase A regulatory subunit 1 alpha (PRKAR1A) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิดและการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และมีการแสดงออกในระดับที่สูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมาใช้เป็นโปรตีนเป้าหมาย (target antigen) สำหรับเซลล์ภูมิคุ้มกันบำบัดชนิดเดินไตริตติ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเซลล์เดินไตริตติจากเซลล์โมโนไซต์ (monocyte-derived dendritic cell) โดยมีโปรตีน PRKAR1A เป็นโปรตีนเป้าหมาย การผลิตเซลล์เดินไตริตตินั้นใช้วิธีการส่งถ่ายยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4) ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาการจากเซลล์โมโนไซต์ให้เป็นเดินไตริตติ และ PRKAR1A ทำหน้าที่เป็นแหล่ง

โปรตีนเป้าหมายเพื่อให้เซลล์เดนไดรติกใช้ในการนำเสนอ (antigen presenting) เพื่อนำมาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีการจดจำและทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะ โดยเรียกเซลล์ที่ผลิตนี้ว่า Smart-PR-DCs การจากศึกษาลักษณะทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunophenotype) ของ Smart-PR-DCs มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับเซลล์ที่ผลิตด้วยวิธีมาตรฐาน (conventional DCs) เมื่อนำ Smart-PR-DCs ไปกระตุ้น effector cells และทดสอบประสิทธิภาพในการจดจำและทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่า effector cells ที่กระตุ้นแล้วมีประสิทธิภาพที่ดีในการทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213 ได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย conventional DCs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าประสิทธิภาพนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับปริมาณ PRKAR1A ในเซลล์ จึงสามารถสรุปได้ว่า Smart-PR-DCs ที่มีการนำเสนอ PRKAR1A antigen มีศักยภาพในการกระตุ้น effector cells ในจดจำและทำลายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะ ซึ่งความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีแบบทางเลือกได้

การศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้ gemcitabine ร่วมกับ CTLs ในเซลล์ CCA (KKU-213) ที่ทนต่อ gemcitabine พบว่าเซลล์ KKU-213 พบว่า ที่ pretreated กับ 2 μ M gemcitabine ถูกฆ่าโดย CTLs ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ CTLs เดี่ยวๆ

ผลการดำเนินงาน

1. สามารถคัดเลือกโปรตีนเป้าหมายคือโปรตีน PRKAR1A และนำมาสร้าง tricistronic lentivirus vector คือ LV-Smart/PR
2. สามารถทดสอบความสามารถของ LV-Smart/(Tumor associated antigen) ในการสร้างโปรตีนที่สำคัญคือ GM-CSF, IL4 และโปรตีนเป้าหมาย ในเซลล์เพาะเลี้ยง (In vitro) ก่อนที่จะนำไปสร้างเป็นไวรัสเพื่อการใช้งานในการสร้าง Smart-DC (Ex Vivo)
3. สามารถนำ LV Smart/(Tumor associated antigen) มาเหนี่ยวนำการสร้างเดนไดรติกเซลล์จากเซลล์โมโนไซด์โดยสามารถตรวจวัดโปรตีนผิวเพื่อบ่งชี้พัฒนาการของเซลล์ภูมิคุ้มกันอักเสบ
4. สามารถผลิตและตรวจสอบความสามารถของเซลล์ภูมิคุ้มกันอักเสบในการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน cytotoxic T cell
5. effector T cell มีประสิทธิภาพดีขึ้น เมื่อมีการใช้ร่วมกับ gemcitabine

2. โครงการวิจัยไวรัสไขเลือดออก

2.1. โครงการวิจัยการค้นหากลไกการทำงานที่เปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจากปฏิกิริยาของ TNF- α และการติดเชื้อไวรัสแดงก่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดโดยเฉพาะผนังเซลล์ในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ร่วมกับ TNF- α โดยใช้เทคนิค 1D polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) และ mass spectrometry
2. เพื่อทดสอบเพื่อยืนยันโปรตีนที่สนใจ ที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยเทคนิค Western blot
3. เพื่อทดสอบ Localization ของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Immunofluorescence assay
4. เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสแดงก่ และการเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เกี่ยวข้องกับกลไกการรั่วไหลของหลอดเลือด

วิธีดำเนินการ

ได้ทำการศึกษาโปรตีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะบริเวณผนังเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ร่วมกับ TNF- α โดยอาศัยเทคนิค 1D polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) และ mass spectrometry ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เลือกโปรตีนที่สนใจที่น่าจะส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (การรั่วของสารน้ำ) โดยผลที่ได้จากเทคโนโลยีดังกล่าวนำมายืนยันผลด้วยเทคนิค Western blot พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกัน วิเคราะห์

ตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนที่สนใจและตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในเซลล์ และพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สอดคล้องกับการรั่วไหลของสารน้ำในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่ติดเชื้อไวรัสแดงก่ำและกระตุ้นด้วย TNF- α

นอกจากนี้ ผลของการวิเคราะห์เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับ TNF- α และมีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำร่วมด้วยโดยวิธี Mass Spectrometry (MS) มีโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง 451 ชนิด หนึ่งในนั้นคือโปรตีน plectin ที่ลดลง การแสดงออกถูกยืนยันโดยการวิเคราะห์แบบ Western blot ในขณะที่การใช้เทคนิค Immunofluorescence staining (IFA) เพื่อแสดง actin stress fiber rearrangement และมีการลดลงของโปรตีน VE-cadherin ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับ TNF- α และมีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำร่วมด้วย การทดสอบการซึมผ่านในหลอดทดลองคือการใช้เพื่อหาความต้านทานทางไฟฟ้าของเซลล์ transepithelial (TEER) ค่า TEER ที่ต่ำ มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ plectin และ VE-cadherin ที่ลดลง และ actin stress fiber rearrangement ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับ DENV2 และ TNF- α สังเกตผลลัพธ์ที่คล้ายกันเมื่อใช้ siRNA knockdown plectin ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

ผลการดำเนินงาน

1. ได้ตัวอย่างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำร่วมกับ TNF- α โดยได้ตรวจสอบปริมาณเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำและการตรวจสอบการตายของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดโดยใช้เทคนิค Flow Cytometry
2. ได้ทำการแยกผนังเซลล์ (membrane-associated protein) จากตัวอย่างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำร่วมกับ TNF- α
3. ได้ทำชนิดของโปรตีน ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดโดยเฉพาะผนังเซลล์ในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสแดงก่ำร่วมกับ TNF- α โดยใช้เทคนิค 1D polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) และ mass spectrometry
4. ทำการวิเคราะห์และคัดเลือกโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อพิจารณาคัดเลือกโปรตีนที่เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงแล้ว น่าจะส่งผลกระทบต่อพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (การรั่วของสารน้ำ)
5. ได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันโปรตีนที่สนใจ ที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยเทคนิค Western blotting โดยผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลจาก 1D polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) และ mass spectrometry
6. ได้ทำการทดสอบ Localization ของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Immunofluorescence assay
7. ตรวจหาการรั่วไหลของสารน้ำในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่ติดเชื้อไวรัสแดงก่ำและกระตุ้นด้วย TNF- α
8. ทราบถึงบทบาทของโปรตีน plectin ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนตัวเชื่อมโยงโครงร่างหลัก (major cytoskeleton linker protein) ที่สำคัญในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมีหน้าที่ในการรักษาโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยเสริมสร้างความสมบูรณ์ของหลอดเลือด (vascular integrity)

2.2. โครงการวิจัยการค้นหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องต่อการสร้างไวรัสแดงก่ำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาโปรตีนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงก่ำที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไวรัสแดงก่ำ
2. เพื่อค้นหาโปรตีนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงก่ำที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายโปรตีนของไวรัสแดงก่ำ

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการลดการแสดงออกของยีนที่สร้าง Coat proteins (COPI และ COPII) และ SNAREs (STX 5 และ NSF) ด้วยวิธี knocked down ด้วย RNA interference ในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7 ที่ติดเชื้อไวรัสแดงก่ำ พบว่า เซลล์ที่ลดการแสดงออกของยีนของ COPI และ COPII สามารถยับยั้งเพิ่มจำนวนของเชื้อ

ไวรัสเด็งกีได้ ในขณะที่เซลล์ที่ลดการแสดงออกของยีนของ STX 5 และ NSF ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกีเมื่อทำการศึกษาระดับโปรตีนของเชื้อไวรัสเด็งกี ทั้งโปรตีน DENV C, prM, E และ NS1 พบว่าโปรตีนของไวรัสมีการสร้างลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่ลดการแสดงออกของยีน COPI นอกจากนี้ยังพบว่า COPI ยังมีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 serotype ในเซลล์เพาะเลี้ยง endothelial ซึ่งจากการศึกษานี้ บ่งชี้ถึงความสำคัญของโปรตีน Coat proteins ที่มีส่วนช่วยในการเกิดการติดเชื้อเด็งกีภายในเซลล์

ผลการดำเนินงาน

1. ค้นพบโปรตีนที่จำเป็นต่อการเคลื่อนย้ายโปรตีนของไวรัสเด็งกี
2. ค้นพบโปรตีนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายโปรตีนของไวรัสเด็งกี

2.3. โครงการวิจัยพัฒนาระบบค้นหาหายาด้านไวรัสเด็งกีจากไลบรารีของยาที่ผ่านการรับรองแล้วจาก USFDA วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาระบบการค้นหาหายาด้านไวรัสเด็งกีจากไลบรารีของยาที่ผ่านการรับรองแล้วจาก US FDA และทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาดังกล่าวที่มีข้อบ่งชี้ในการใช้ใหม่ในการลดการสร้างไวรัสเด็งกีในระบบ cell culture
2. เพื่อพัฒนาระบบการค้นหาและทดสอบประสิทธิภาพของยาด้านไวรัสจากไลบรารีของยาที่ผ่านการรับรองแล้วจาก US FDA ในหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาระบบการค้นหาหายาด้านไวรัสเด็งกีและทดสอบประสิทธิภาพของยาที่ผ่านการรับรองแล้ว ซึ่งยามีผลในการลดการสร้างไวรัสเด็งกีทั้งในระบบ cell culture และสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีที่นำมาใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งระยะต่อไปจะนำยาที่ได้คัดเลือกไว้เข้าสู่ระบบที่ได้ถูกพัฒนาขึ้น และจากการทดลองพบว่า N-acetyl cysteine (NAC) ช่วยลดการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ HepG2 และ ลดการบาดเจ็บของตับและการตายของเซลล์ตับในหนูที่ติดเชื้อ

ผลการดำเนินงาน

1. สามารถพัฒนาระบบการค้นหาหายาด้านไวรัสเด็งกีจากไลบรารีของยาที่ผ่านการรับรองแล้วจาก US FDA และทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาดังกล่าวที่มีข้อบ่งชี้ในการใช้ใหม่ในการลดการสร้างไวรัสเด็งกีในระบบ cell culture
2. ได้พัฒนาระบบการค้นหาและทดสอบประสิทธิภาพของยาด้านไวรัสจากไลบรารีของยาที่ผ่านการรับรองแล้วจาก US FDA ในหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี
3. ศึกษาบทบาทและกลไกของ N-acetyl cysteine (NAC) ในเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

2.4. โครงการวิจัยการใช้เทคโนโลยีเอสไออาร์เอ็นเอในการยับยั้งและศึกษากลไกกระบวนการตายโดยอะพอพโทซิสของเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการตายโดยอะพอพโทซิสโดยใช้เทคนิค apoptosis siRNA library screening
2. เพื่อศึกษากลไกกระบวนการตายโดยอะพอพโทซิสในเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยพบว่า การทำงานของ caspase 3 ลดลงในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และขาดการแสดงออกของยีน sphingosine kinase 2 (SPHK2) บทบาทจำเพาะของ SPHK2 ในกระบวนการอะพอพโทซิสถูกยืนยันด้วยการทดลองแยกเส้น siRNA, หาประสิทธิภาพของการ knockdown และการหาปริมาณไวรัส การทดลองด้วยวิธี immunofluorescent assay แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกที่มากขึ้น รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของโปรตีน SPHK2 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส สาร ABC294640 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง SPHK2 ถูกนำมาทดลองและพบว่า kinase activity ของ SPHK2 จำเป็นต่อการตายโดยอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส นอกจากนั้นแล้วการ

ทดลองยังพบว่า SPHK2 มีบทบาทต่อกระบวนการตายโดยอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีทั้งสี่ serotype แต่บทบาทนี้ถูกจำกัดอยู่ในเฉพาะเซลล์ตับที่เชื้อเท่านั้น ผลการทดลองทั้งหมดบ่งบอกถึงบทบาทของ SPHK2 ต่อการตายโดยอะพอพโทซิสผ่าน intrinsic pathway ของเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

ผลการดำเนินงาน

1. พบว่าการทำงานของ caspase 3 ลดลงในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และขาดการแสดงออกของยีน sphingosine kinase 2 (SPHK2) ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการอะพอพโทซิส
2. ได้ทำการ knockdown ยีน SPHK2 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี และติดตามผลกระทบที่มีต่อไวรัสเด็งกี

2.5. โครงการวิจัย “การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี กับโปรตีน chaperones ER-resident”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ของ Dengue virus (DENV) NS1 โปรตีนกับ chaperones ER-resident โปรตีนที่สำคัญ 3 โปรตีน ได้แก่ GRP78, Calnexin และ calreticulin ในเซลล์ Huh7 ที่ติดเชื้อ

วิธีดำเนินการ

การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง 1 (NS1) ของเด็งกีกับ host ER chaperones protein ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ GRP78, Calnexin และ Calreticulin ในเซลล์ตับชนิด Huh7 ที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัส โดยทดสอบความสัมพันธ์ด้วยเทคนิค Immunofluorescence assay ดูตำแหน่งของโปรตีนที่อยู่ด้วยกันภายในเซลล์ และเทคนิค Co-Immunoprecipitation เพื่อทดสอบการจับกันของโปรตีนด้วยแอนติบอดีจำเพาะ พบว่า GRP78 มีความสัมพันธ์ที่โดดเด่นในการจับกับ Dengue NS1 protein จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูบทบาทของ GRP78 ที่มีผลต่อไวรัส โดยใช้ siRNA mediated transfection และระบบ DENV replicon transfection เพื่อไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน GRP78 พบว่าการลดลงของโปรตีน และยีนของ GRP78 ส่งผลให้การสร้าง NS1 production ภายในเซลล์และ NS1 secretion ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ลดลงและสร้างช้าลง แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง viral RNA replication คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาดำเนินงานของ GRP78 ที่จับกับ NS1 โดยแบ่งบริเวณตาม domain ที่สำคัญของ GRP78 แล้วทดสอบด้วยเทคนิค Co-Immunoprecipitation พบว่า บริเวณ full-length และ substrate binding domain (SBD) เท่านั้นที่จับกับส่วนของ NS1 ของ DENV ส่วน GRP78 บริเวณ ATPase domain ไม่พบการจับกับ NS1 ทำการศึกษาการจำลองระบบโดยวิธีพลศาสตร์ของโมเลกุล (Molecular dynamics simulations) เพื่อยืนยันการจับกันของตำแหน่งของทั้งสองโปรตีน โดยบริเวณที่ GRP78 binding site เกิดขึ้นบน β -roll domain and connector subdomains ของ NS1 จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนไวรัส โดยมีเป้าหมายในการยับยั้งการทำงานร่วมกันของ GRP78 และ DENV NS1 ได้ในอนาคต

ผลการดำเนินงาน

1. ค้นพบการปฏิสัมพันธ์กันของโปรตีน NS1 ของ DENV กับโปรตีน GRP78 ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส ซึ่งความสัมพันธ์ของทั้งสองโปรตีนส่งผลต่อการสร้าง NS1 production ภายในเซลล์และ NS1 secretion ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ลดลงและสร้างได้ช้าลง แต่ไม่มีผลในการสร้าง viral RNA replication
2. การจำลองระบบโดยวิธีพลศาสตร์ของโมเลกุลในการจับกันของสองโปรตีนเพื่อทดสอบหาบริเวณที่มีจับกันอย่างจำเพาะ พบบริเวณที่มีการจับกันอย่างจำเพาะที่บริเวณ substrate binding domain ของ GRP78 และบริเวณ β -roll domain และ connector subdomains ของ NS1

2.6. โครงการวิจัย “การค้นหารายการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเด็งกี”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหารายการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเด็งกี
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้เลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ α -mangostin (α -MG) ซึ่งเป็นสารที่สกัดเปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) และถูกนำมาใช้ในการแพทย์ เพื่อมาทดสอบประสิทธิภาพในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี ผลการทดลองพบว่า α -MG สามารถยับยั้งทั้งการผลิตเชื้อไวรัสเดงกี และการแสดงออกของ cytokine/ chemokine เมื่อทดสอบในมะเร็งเซลล์ตับ (HepG2) ซึ่ง α -MG สามารถยับยั้งไวรัสได้ทั้ง 4 serotypes อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังช่วยลด cytokine (IL-6 และ TNF- α) และ chemokine (RANTES, MIP-1 β และ IP-10) อีกด้วย และจากการทดลองกับสารสกัดจากสีเสียด พบว่าสามารถลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ในเซลล์ vero

ผลการดำเนินงาน

1. ค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากผลมังคุด α -mangostin (α -MG) สามารถยับยั้งการผลิตเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์ตับ HepG2
2. สามารถทดสอบประสิทธิภาพของ α -MG ในเซลล์ HepG2 ซึ่งให้ผลช่วยลด cytokine ได้ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

2.7. โครงการวิจัยการพัฒนาระบบยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยมุ่งเป้าที่อาร์เอ็นเอ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาสายต้านไวรัสเดงกีโดยมุ่งเป้าที่อาร์เอ็นเอของไวรัสเดงกี
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านไวรัสต่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยพบว่า vivo-MO-1 สามารถจับกับอาร์เอ็นเอของไวรัสเดงกีได้ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ viral RNA, viral protein, viral infection และ viral production ใน Vero cells ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ DENV-1, DENV-3 และ DENV-4 อีกด้วย อย่างไรก็ตาม vivo-MO-1 สามารถยับยั้ง DENV-4 ได้มีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งน่าจะเกิดจากการมีเบสที่ไม่สามารถจับกันได้ 5 ตำแหน่ง จึงจำเป็นต้องมีการออกแบบและสังเคราะห์ vivo-MO-2 ให้จับได้อย่างสมบูรณ์กับ DENV-4 ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง DENV-4 ได้ดีกว่า vivo-MO-1 นอกจากนี้ยังพบว่า vivo-MOs มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อและการสร้างไวรัสเดงกีใน A549 cells และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่ม ปริมาณและจำนวนของ viral RNA, viral protein, viral infection และ viral production ใน immature monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า vivo-MOs ในปริมาณความเข้มข้นระดับ submicromolar ที่นำมาทำการศึกษานี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและสามารถยับยั้ง การติดเชื้อไวรัสเดงกีได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ชนิด Vero, A549, และ MDDCs การศึกษานี้จึงสนับสนุนการพัฒนา vivo-MOs ต่อไป เพื่อเป็นยาต้านไวรัสเดงกีโดยมุ่งเป้าที่อาร์เอ็นเอของไวรัส

ผลการดำเนินงาน

1. พบว่า vivo-morpholinos (vivo-MOs) สามารถจับกับส่วนอาร์เอ็นเอของไวรัสเดงกี
2. ทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านไวรัสต่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี Vivo-MO-1 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ RNA, protein ของไวรัสเดงกี และยับยั้งการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของไวรัสอีกด้วย

3. โครงการวิจัยโรคไต

3.1. การทำอณูวินิจฉัย (molecular diagnosis) ของการกลายพันธุ์ในยีน *Solute Carrier Family 4 Member 1 (SLC4A1)* ที่เกี่ยวข้องกับโรคไตผิดปกติในการขับกรดซึ่งมีการถ่ายทอดโรคแบบ autosomal recessive

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยยีน SLC4A1 ให้มีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

การกลายพันธุ์ชนิด Southeast Asian ovalocytosis (SAO) และ band 3 Bangkok 1 (G701D) ในยีน *solute carrier family 4 member 1 (SLC4A1)* ถือเป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยไทยซึ่งเป็นโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอดโรคแบบ autosomal recessive งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด SAO และ G701D ในผู้ป่วยใหม่จำนวน 10 คนที่ยังไม่ทราบสาเหตุของโรคและสมาชิกครอบครัวโดยใช้วิธี high-resolution melting (HRM) จากนั้นจึงยืนยันผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของวิธี HRM ด้วยวิธี polymerase chain reaction–restriction fragment-length polymorphism (PCR-RFLP) และเทคนิค DNA sequencing ผลที่ได้พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด SAO แต่มีการกลายพันธุ์ชนิด G701D โดยมีจีโนไทป์แบบ homozygous G701D ส่วนสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยมีจีโนไทป์แบบ homozygous wild-type หรือ heterozygous G701D ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า Homozygous G701D เป็นสาเหตุของโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่พบได้บ่อยในประชากรเด็กไทย และวิธี HRM ก็เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A1* ที่เป็นสาเหตุของโรคไตผิดปกติในการขับกรดซึ่งมีการถ่ายทอดโรคแบบ autosomal recessive ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประชากรอื่น ๆ

ผลการดำเนินงาน

1. ได้วิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็วในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A1* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด
 2. ใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยในพาหะที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A1* และการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่แพทย์ในการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ในครอบครัวที่มีผู้ป่วย ช่วยในการวางแผนที่จะดูแลรักษาผู้ป่วยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป
- 3.2. กลไกการติดค้างของโปรตีนแอนไอออน เอ็กแซนเจอร์วัน ที่ผิดปกติในกอลจิแอฟฟาราตัสของเซลล์ไตของมนุษย์

วัตถุประสงค์

1. การศึกษาเพื่อยืนยันตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนแอนไอออน เอ็กแซนเจอร์วัน ที่ผิดปกติ ชนิดที่พบในไต (KAE1 G701D)
2. ศึกษาการปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง KAE1 G701D กับ โปรตีนแอดิเตอร์ (adaptor proteins)
3. ค้นหากลไกการติดค้างของโปรตีน KAE1 G701D ที่ติดค้างอยู่ในกอลจิแอฟฟาราตัส (Golgi apparatus)
4. ศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่าง KAE1 G701D กับกระบวนการ autophagy

วิธีดำเนินการ

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพื่อชี้ให้เห็นถึงโปรตีน KAE1 G701D ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับ โปรตีนแอดิเตอร์ที่ช่วยในการขนโปรตีนออกจากกอลจิแอฟฟาราตัส แต่โปรตีน KAE1 G701D สามารถจับกับโปรตีน COPI ภายในเซลล์และทำให้โปรตีน KAE1 G701D ติดค้างอยู่ในกอลจิแอฟฟาราตัส และเมื่อทำการลดการแสดงออกของโปรตีน COPI พบว่าโปรตีน KAE1 G701D กลับไปแสดงออกยังผิวเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ดังนั้นโปรตีน COPI จึงเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการดักจับโปรตีน KAE1 G701D ให้ค้างอยู่ในกอลจิแอฟฟาราตัส นอกจากนี้ การใช้สาร cystamine ช่วยให้โปรตีน KAE1 G701D ไปแสดงออกที่ผิวเซลล์ได้โดยอาศัยหลักการกระตุ้นกระบวนการ autophagy

ผลการดำเนินงาน

1. พบว่าตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีน KAE1 ที่ผิดปกติชนิด G701D (KAE1 G701D) ค้างอยู่ในกอลจิแอฟฟาราตัส เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน KAE1 ที่ปกติ ซึ่งมีการแสดงออกที่ผิวเซลล์ โดยผลการทดลองยืนยันกับการศึกษาที่ผ่านมา

2. ค้นพบว่าโปรตีน Coat protein complex I (COPI) มีปฏิสัมพันธ์กับ KAE1 G701D ซึ่งโปรตีน COPI เป็นโปรตีนในกอลจิแอปพาราตัส และทำหน้าที่ในการดักจับโปรตีนที่ผิดปกติในกอลจิแอปพาราตัส
3. สามารถลดการติดค้างของ KAE1 G701D ในกอลจิแอปพาราตัส ให้ไปแสดงออกยังผิวเซลล์ โดยอาศัยสาร cystamine ซึ่งมีรายงานว่ามีส่วนช่วยให้โปรตีนบางตัวที่ผิดปกติให้ไปแสดงออกที่ผิวเซลล์ ได้โดยอาศัยหลักการการกระตุ้นขบวนการ autophagy

3.3. โครงการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไตในครอบครัวคนไทย ด้วยเทคนิค exome sequencing และศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกลไกการเกิดโรคไตด้วยเทคนิคทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหายีนก่อโรคไตและโรคไตผิดปกติในการขับกรด ในคนไทยภาคอีสาน โดยใช้เทคนิค Exome sequencing
2. เพื่อศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกลไกการเกิดโรคไตด้วยเทคนิคทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยา

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์กันระหว่างความผันแปรของยีน *F2* ที่ตำแหน่ง rs5896 (NM_000506.4:c.494C>T; NP_000497.1:p.Thr165Met) กับปริมาณโปรตีน prothrombin (UPTF1) ในปัสสาวะ ซึ่งโปรตีน UPTF1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดนิ่ว จากการศึกษาพบว่าคนที่ความผันแปรแบบจีโนทัยป์ที่เป็นอัลลีล C จะมีปริมาณ UPTF1 ในปัสสาวะมากกว่าคนที่จีโนทัยป์เป็นอัลลีล T ซึ่งอาจทำให้อธิบายได้ว่า คนที่มีจีโนทัยป์ที่เป็นอัลลีล C จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วน้อยกว่าคนที่จีโนทัยป์ที่เป็นอัลลีล T

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยทำการตรวจหาความผิดปกติของยีนที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไต โดยทำ Genome-wide linkage study ร่วมกับการทำ exome sequencing ในครอบครัวผู้ป่วยโรคไต พบว่ายีน *SCN10A* ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน voltage-gated sodium channel type X, alpha subunit (Nav1.8) ให้ค่า LOD score สูงที่สุด และพบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งที่อยู่บนแขนข้างเดียวกันของโครโมโซม (N909K and K1809R) ที่มีการถ่ายทอดจากผู้ป่วยรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง และไม่พบในประชากรไทยอีสานที่มีสุขภาพดี ซึ่งเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ จำนวน 180 คน และยังพบมิวเตชันของยีนนี้ในครอบครัวอื่นเพิ่มเติม (V1149M) อีกหนึ่งครอบครัวด้วย จากผลการวิเคราะห์เหล่านี้ สามารถบ่งชี้ว่า ยีนนี้น่าจะเป็นยีนก่อโรคใหม่ในครอบครัวผู้ป่วยโรคไตในประชากรไทยอีสาน เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน Nav1.8 ในไตของมนุษย์และศึกษาผลของความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *SCN10A* ในเซลล์เพาะเลี้ยง HEK293 พบว่าโปรตีนไม่เสถียรและนำพาโซเดียมเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ซึ่งสนับสนุนว่ายีน *SCN10A* เป็นสาเหตุของโรคไตจริง

ในครอบครัวที่มีผู้ป่วยโรคไตหลายคน อีกจำนวน 2 ครอบครัว 2 ยีน คือ TMEM120B ตำแหน่ง c.874C>T ที่น่าจะเป็นยีนที่ส่งผลต่อการเกิดโรคไตของครอบครัว KKRS015 และยีน PBK ตำแหน่ง c.127G>A ที่น่าจะเป็นยีนที่ส่งผลต่อการเกิดโรคไตของครอบครัว UBRS033 เนื่องจากพบการถ่ายทอดไปคนที่เป็นโรคไตในครอบครัว แต่ยังไม่พบความผิดปกติของยีนดังกล่าวจากการทดสอบจีโนทัยป์ และการ screen หา mutation ภายในยีนจากผู้ป่วยรายอื่นที่อยู่ต่างครอบครัวกัน อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของโปรตีนที่ผิดปกติและผิดปกติต่อไปเพื่อสนับสนุนว่าความผิดปกติของยีนดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคไต

ผลการดำเนินงาน

1. พบยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคไตและโรคไตผิดปกติในการขับกรด ในคนไทยภาคอีสาน โดยใช้เทคนิค exome sequencing

2. ได้ศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีนดังกล่าวต่อกลไกการเกิดโรคนี้ด้วยเทคนิคทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยา เพิ่มเติม

4. โครงการวิจัยโรคเบาหวาน

4.1. โครงการวิจัย “การศึกษาอณูพันธุศาสตร์ของโรคเบาหวาน”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์ผลและคัดเลือกยีนที่น่าจะเป็นยีนก่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคเบาหวานที่มีลักษณะการถ่ายทอดแบบยีนที่ พร้อมทั้งทดสอบระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกมาแล้ว ในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน ด้วยวิธี RT-PCR และ Western blot

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยใช้เทคนิค exome sequencing ซึ่งผลการวิเคราะห์พบความแปรผันของยีนที่น่าสนใจ จำนวน 122 ตำแหน่ง ซึ่งความแปรผันยีน DNAJC3 ตำแหน่ง p.H238N พบว่ามีความสัมพันธ์ในครอบครัวผู้ป่วยเบาหวาน และไม่พบในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในยีนที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวน 8 ยีน ได้แก่ ยีน *KCNQ1*, *CDKN2A/2B*, *CDKAL1*, *HHEX*, *MTNR1B*, *SLC30A8*, *TCF7L2* และ *UBE2E2* ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ชาวไทย จำนวน 500 คน และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 500 คน โดยใช้เทคนิค high resolution melting analysis (HRM) หรือ เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ทั้งนี้พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *KCNQ1*, *CDKN2A/2B*, *HHEX*, *SLC30A8* และ *TCF7L2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า odds ratio (OR) ในช่วง 1.19 to 1.79 ($P = 4.7 \times 10^{-2}$ to 2×10^{-3}) นอกจากนี้ ยังพบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *KCNQ1* มีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาและระดับคลอเลสเตอรอล และความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *CDKN2A/2B* และยีน *TCF7L2* มีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาและดัชนีมวลกายอีกด้วย ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงเกี่ยวข้องกับของความแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *KCNQ1*, *CDKN2A/2B* และ *TCF7L2* กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 รวมทั้งระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาและเมตาบอลิซึมของไขมัน ในประชากรไทย ทั้งนี้การศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะช่วยยืนยันบทบาทของความแปรผันทางพันธุกรรมในยีนดังกล่าวในประชากรไทย

ในครอบครัวของผู้ป่วยเบาหวานชนิด autosomal dominant พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *SLC19A2* (c.A1063C: p.Lys355Gln) และเมื่อศึกษาด้านบทบาทหน้าที่แสดงให้เห็นว่าการขาด *SLC19A2* ทำให้เกิดการหลั่งอินซูลินที่บกพร่องร่วมกับความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย, สูญเสียการป้องกันการต่อต้านอนุมูลอิสระและวัฏจักรของเซลล์ การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าบทบาทของ *SLC19A2* เกี่ยวข้องกับการทำงานของเบต้าเซลล์และการอยู่รอดของเซลล์

ผลการดำเนินงาน

1. ได้คัดเลือกยีนที่น่าจะเป็นยีนก่อโรคเบาหวาน จากแต่ละครอบครัวแล้ว มาทดสอบระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือก ในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน ด้วยวิธี RT-PCR และ Western blot ผลพบว่ายีนที่คัดเลือกมา มีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของหนูและของมนุษย์ ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน
2. ได้ทำการลดการแสดงออกของยีนที่ต้องการด้วย siRNA แล้วพบว่ายีนที่ได้น่าจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของมนุษย์ ซึ่งผู้วิจัยจะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่ได้ต่อไป

4.2. โครงการวิจัย “การทดสอบหน้าที่ผิดปกติของยีนกลายพันธุ์ ที่พบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดโมดีชาวไทย”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบหน้าที่ของการกลายพันธุ์ของยีน *HNF-1 α* ต่อการแสดงออกของโปรตีน
2. เพื่อทดสอบความผิดปกติของยีนที่มีการกลายพันธุ์ *HNF-1 α* ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ช่วยป้องกันการตายของเซลล์ ด้วยวิธี luciferase reporter assay และทดสอบคุณสมบัติการจับของโปรตีน *HNF-1 α* บนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย ด้วยวิธี EMSA

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *HNF-1 α* ด้วยการใช้พลาสมิดที่มียีน *HNF-1 α* ปกติเป็นต้นแบบ จากนั้นพลาสมิดที่มียีน *HNF-1 α* ที่ปกติและ *HNF-1 α* กลายพันธุ์ จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ด้วยวิธี transfection หลังจากนั้นจะทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน การเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ตลอดจนการกระตุ้นแสดงออกของยีนบนยีนเป้าหมาย ด้วยวิธี western blot analysis, immunofluorescence staining และ dual-luciferase reporter assay ผลจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน และการเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *HNF-1 α* D80V, P475L, และ G554fsX556 ไม่มีผลกระทบต่อแสดงออกของโปรตีนและการเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ในขณะที่กลายพันธุ์ของยีน *HNF-1 α* R203C มีผลต่อการเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส โดยพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะค้างค้างอยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึม ซึ่งสอดคล้องกับผลการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ที่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ *HNF-1 α* R203C ต่อยประสิทธิภาพอย่างมากในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ในขณะที่การกลายพันธุ์อื่น พบมีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน *HNF-1 α* ปกติ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีแผนที่จะทำการทดสอบความผิดปกติของโปรตีนในการจับกับดีเอ็นเอบนโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายด้วยวิธี Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ซึ่งอยู่ในระหว่างทำการทดลอง เพื่อทดสอบกลไกความผิดปกติของโปรตีน น่าจะมีผลทำให้การทำงานของเซลล์เบต้าหรือจำนวนเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคเบาหวาน

ผลการดำเนินงาน

1. ได้ทดสอบความผิดปกติของยีนที่มีการกลายพันธุ์ *HNF-1 α* ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ช่วยป้องกันการตายของเซลล์ ด้วยวิธี luciferase reporter assay ได้ทำการทดลองนำร่องแล้ว และพบความแตกต่างในระดับการกระตุ้นการแสดงออกของยีนดังกล่าว ระหว่างเซลล์เบต้าที่มีโปรตีนปกติ *HNF-1 α* และโปรตีนที่มีการกลายพันธุ์
2. การทดสอบคุณสมบัติการจับของโปรตีน *HNF-1 α* บนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย ด้วยวิธี EMSA นั้น ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองแล้ว ซึ่งก็พบว่าโปรตีนปกติ *HNF-1 α* สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ

4.3. การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของโปรตีน Pax4 ในการควบคุมการตายของเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของหนู

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีน Pax4 ในการควบคุมจำนวนเซลล์เบต้าจากตับอ่อน ด้วยเทคนิค siRNA
2. เพื่อประเมินจำนวนเซลล์เบต้าหรือการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธี MTT และ BrdU-incorporation assay

วิธีดำเนินการ

โรคเบาหวานชนิดที่สองเป็นโรคเบาหวานชนิดที่พบบ่อยที่สุด เกิดจากพหุปัจจัย จากความผิดปกติของพันธุกรรม ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรค และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ส่วนโรคเบาหวานชนิดโมดี เป็น

โรคเบาหวานที่มีการถ่ายทอดแบบยีนเดี่ยว มีลักษณะจำเพาะ คือ การถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยเกิดโรคตั้งแต่อายุน้อย และเกิดจากความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เบต้า ในปัจจุบัน มีรายงานการกลายพันธุ์ของยีนอย่างน้อย 13 ยีน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดโมดีจากการศึกษาก่อนหน้า โดยกลุ่มวิจัยโรคเบาหวาน โรงพยาบาลศิริราช พบว่า ความผันแปรของยีน *Paired box 4 (PAX4)* สัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และการกลายพันธุ์ของยีนนี้ ยังทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดโมดีอีกด้วย เนื่องจากบทบาทของ *PAX4* ในกระบวนการตายแบบอะพ็อพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์เบต้า ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบความสำคัญของ *PAX4* ในการอยู่รอดของเซลล์เบต้า โดยลดการแสดงออกของ *Pax4* ด้วย siRNA ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ที่มี *Pax4* ลดลง จะมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า ในขณะที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และเมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายหรือการส่งทอดสัญญาณของเซลล์ ด้วยวิธี real-time PCR array พบยีน *Wnt3a*, *Bcl2l1* (Bcl-xL), และ *Bcl2l2* (Bcl-w) มีการแสดงออกลดลง ในเซลล์ที่มี *Pax4* น้อยลง ซึ่งได้มีการทดสอบยืนยันการลดลงของยีนเหล่านี้ ในระดับ mRNA และโปรตีน ด้วยวิธี real-time PCR และ Western blot โดยลำดับ การศึกษานี้ยังได้รายงานการค้นพบยีน *Wnt3a* และ *Bcl2l2* (Bcl-w) ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายใหม่ที่ถูกควบคุมโดย *Pax4* ดังนั้น *Pax4* จึงเป็นโปรตีน transcription factor สำคัญที่ควบคุมการอยู่รอดของเซลล์เบต้า ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ช่วยต้านการตายของเซลล์ ยีน *Wnt3a* และ *Bcl2l2* เป็นยีนที่มีการรายงานใหม่ ว่าถูกควบคุมโดย *Pax4* ความเข้าใจถึงการทำงานของ *Pax4* ทั้งในกระบวนการพัฒนาการของเซลล์เบต้า การดำรงอยู่รอดและการตายของเซลล์ จะนำไปสู่การค้นหาวิธีใหม่ในการรักษาโรคเบาหวาน

ผลการดำเนินงาน

1. ได้ทำการศึกษานำที่ของโปรตีน *Pax4* ในการควบคุมจำนวนเซลล์เบต้าจากตับอ่อน ผลการทดลองพบว่า เซลล์เบต้าที่ถูกลดการแสดงออกของยีน *Pax4* ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อยีน ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของหนู เมื่อเทียบกับเซลล์เบต้าที่ได้รับ siRNA control กลุ่มควบคุมเชิงลบ
2. ค้นพบยีนเป้าหมายใหม่ของ *Pax4* ที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ และช่วยป้องกันการตายของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อหากลไกในระดับโมเลกุลที่ *Pax4* น่าจะไปควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ด้วยวิธี luciferase reporter assay

4.4. การศึกษาผลของสารสกัดจากพืช *Costus pictus* ต่อการหลั่งอินซูลินของเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของมนุษย์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเตรียมสารสกัดจากพืช *Costus pictus* แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติด้วยวิธี HPLC
2. เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลต่อการตายของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน

วิธีดำเนินการ

คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบผลกระทบของสารสกัดจากต้นอินซูลินต่อความเป็นพิษและการแบ่งตัวของเซลล์บีต้าเพาะเลี้ยง (INS-1) ซึ่งมีต้นกำเนิดจากหนู พบว่าสารสกัดอย่างหยาบของต้นอินซูลินสามารถเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของเซลล์บีต้าเพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านเบาหวานของต้นอินซูลินจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนารักษาโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต

ผลการดำเนินงาน

1. ได้วิธีการเตรียมสารสกัดจากพืช *Costus pictus* อย่างเหมาะสม
2. ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลต่อการตายของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน 50% และเมื่อคัดเลือกความเข้มข้นของสารสกัดไปบ่มร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยงเบต้าจากตับอ่อนของหนู พบว่า ชุดของสารสกัดบางชนิดมีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของหนู

Output ที่ได้จากโครงการ

Quartile 1

1. Duangtum N, Junking M, Phadngam S, Sawasdee N, Castiglioni A, Charngkaew K, et al. **Y**-COPI mediates the retention of kAE1 G701D protein in Golgi apparatus - a mechanistic explanation of distal renal tubular acidosis associated with the G701D mutation. *Biochem J.* 2017;474(15):2573-84. Impact Factor : 3.797
2. Rungroj N, Nettuwakul C, Sawasdee N, Sritippayawan S, **Yenchitsomanus PT**. Correlation between genotypes of F2 rs5896 (p.Thr165Met) polymorphism and urinary prothrombin fragment 1. Urolithiasis. 2018 Aug;46(4):405-407. Impact Factor : 1.816
3. Kooptiwut S, Kaewin S, Semprasert N, Sujitjoo J, **Junking M**, Suksri K, et al. Estradiol Prevents High Glucose-Induced beta-cell Apoptosis by Decreased BTG2 Expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):12256. Impact Factor : 4.122
4. Kooptiwut S, Wanchai K, Semprasert N, Srisawat C, **Yenchitsomanus PT**. Estrogen attenuates AGTR1 expression to reduce pancreatic beta-cell death from high glucose. *Sci Rep.* 2017;7(1):16639. Impact Factor : 4.122
5. Nettuwakul C, Praditsap O, Sawasdee N, **Rungroj N**, Ruamyod K, Watanapa WB, et al. Loss-of-function mutations of SCN10A encoding NaV1.8 alpha subunit of voltage-gated sodium channel in patients with human kidney stone disease. *Sci Rep.* 2018;8(1):10453. Impact Factor : 4.122
6. Panya A, Thepmalee C, Sawasdee N, Sujitjoo J, Phanthaphol N, **Junking M**, et al. Cytotoxic activity of effector T cells against cholangiocarcinoma is enhanced by self-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Oct;67(10):1579-1588. Impact Factor : 4.225
7. Kooptiwut S, Kaewin S, Semprasert N, Sujitjoo J, **Junking M**, Suksri K, et al. Estradiol Prevents High Glucose-Induced beta-cell Apoptosis by Decreased BTG2 Expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):12256. Impact Factor : 4.122
8. **Jungtrakoon P**, Shirakawa J, Buranasupkajorn P, Gupta MK, De Jesus DF, Pezzolesi MG, Panya A, Hastings T, Chanprasert C, Mendonca C, Kulkarni RN, Doria A. Loss-of-Function Mutation in Thiamine Transporter 1 in a Family with Autosomal Dominant Diabetes. *Diabetes.* 2019 May;68(5):1084-1093. Impact Factor : 7.199

Quartile 2

1. **Junking M**, Grainok J, Thepmalee C, Wongkham S, **Yenchitsomanus PT**. Enhanced cytotoxic activity of effector T-cells against cholangiocarcinoma by dendritic cells pulsed with pooled mRNA. *Tumor Biol.* 2017;39(10):1010428317733367. Impact Factor : 3.650
2. Chanthick C, Suttitheptumrong A, Rawarak N, **Pattanakitsakul SN**. Transcytosis Involvement in Transport System and Endothelial Permeability of Vascular Leakage during Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2018 Feb 8;10(2). pii: E69. Impact Factor : 3.761
3. Thepmalee C, Panya A, **Junking M**, Chieochansin T, **Yenchitsomanus PT**. Inhibition of IL-10 and TGF-beta receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(6):1423-31. Impact Factor : 2.229

4. Sootichote R, Thuwajit P, Singsookawat E, Warnnissorn M, **Yenchitsomanus PT**, Ithimakin S, et al. Compound A attenuates toll-like receptor 4-mediated paclitaxel resistance in breast cancer and melanoma through suppression of IL-8. *BMC Cancer*. 2018;18(1):231. Impact Factor : 3.288
5. Sreekanth GP, **Yenchitsomanus PT**, Limjindaporn T. Role of mitogen-activated protein kinase signaling in the pathogenesis of dengue virus infection. *Cell Signal*. 2018;48:64-8. Impact Factor : 3.487
6. Kulanuwat S, Tangjittipokin W, **Jungtrakoon P**, Chanprasert C, Sujitjoo J, Binnima N, et al. DNAJC3 mutation in Thai familial type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Med*. 2018;42(2):1064-73. Impact Factor : 2.784
7. **Rungroj N**, Nettuwakul C, Sawasdee N, Sangnual S, Deesai N, Misgar RA, et al. Distal renal tubular acidosis caused by tryptophan-aspartate repeat domain 72 (WDR72) mutations. *Clin Genet*. 2018 Nov;94(5):409-418. Impact Factor : 3.512
8. **Rungroj N**, Nettuwakul C, Sawasdee N, Sritippayawan S, **Yenchitsomanus PT**. Correlation between genotypes of F2 rs5896 (p.Thr165Met) polymorphism and urinary prothrombin fragment 1. Urolithiasis. 2018;46(4):405-7. Impact Factor : 2.038
9. Suttiheptumrong A, Rawarak N, Reamtong O, Boonnak K, **Pattanakitsakul SN**. Plectin is Required for Trans-Endothelial Permeability: A Model of Plectin Dysfunction in Human Endothelial Cells After TNF-alpha Treatment and Dengue Virus Infection. *Proteomics*. 2018;18(23):e1800215. Impact Factor : 3.532

Quartile 3

1. Tarasuk M, Songprakhon P, Chimmma P, Sratongno P, Na-Bangchang K, **Yenchitsomanus PT**. Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine/chemokine expression. *Virus Res*. 2017;240:180-9. Impact Factor : 2.484
2. Phumesin P, **Junking M**, Panya A, Yongpitakwattana P, Noisakran S, Limjindaporn T, et al. Vivo-morpholino oligomers strongly inhibit dengue virus replication and production. *Arch Virol*. 2018 Apr;163(4):867-876. Impact Factor : 2.160
3. Tongmuang N, Yasamut U, Songprakhon P, Dechtawewat T, Malakar S, Noisakran S, et al. Coat protein complex I facilitates dengue virus production. *Virus Res*. 2018;250:13-20. Impact Factor : 2.484
4. Plengvidhya N, Chanprasert C, Chongjaroen N, **Yenchitsomanus PT**, Homsanit M, Tangjittipokin W. Impact of KCNQ1, CDKN2A/2B, CDKAL1, HHEX, MTNR1B, SLC30A8, TCF7L2, and UBE2E2 on risk of developing type 2 diabetes in Thai population. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):93. Impact Factor : 1.913
5. Malakar S, Sreelatha L, Dechtawewat T, Noisakran S, **Yenchitsomanus PT**, Chu JJH, et al. Drug repurposing of quinine as antiviral against dengue virus infection. *Virus Res*. 2018 Aug 15;255:171-178. Impact Factor : 2.484
6. Phumesin P, **Junking M**, Panya A, Yongpitakwattana P, Noisakran S, Limjindaporn T, et al. Inhibition of dengue virus replication in monocyte-derived dendritic cells by vivo-morpholino oligomers. *Virus Res*. 2019;260:123-8. Impact Factor : 2.484

7. Panya A, Yongpitakwattana P, Budchart P, Sawasdee N, Krobthong S, Paemanee A, et al. Novel bioactive peptides demonstrating anti-dengue virus activity isolated from the Asian medicinal plant *Acacia Catechu*. *Chem Biol Drug Des*. 2019 Feb;93(2):100-109. Impact Factor : 2.328

Quartile 4

1. Kulanuwat S, Jungtrakoon P, Tangjittipokin W, **Yenchitsomanus PT**, Plengvidhya N. Fanconi anemia complementation group C protection against oxidative stress-induced beta cell apoptosis. *Mol Med Rep*. 2018;18(2):2485-91. Impact Factor : 1.922
2. Deejai N, Wisanuyotin S, Nettuwakul C, Khositseth S, Sawasdee N, Saetai K, **Yenchitsomanus PT**, Rungroj N. Molecular Diagnosis of Solute Carrier Family 4 Member 1 (SLC4A1) Mutation-Related Autosomal Recessive Distal Renal Tubular Acidosis. *Lab Med*. 2019 Jan 1;50(1):78-86. Impact Factor : 1.222

Medical Proteomics Research

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของโปรตีนกระบวนการเกิดนิวไนโตของผลึกชนิดต่างๆ ที่พบในปัสสาวะ
2. เพื่อศึกษาบทบาทสำคัญของปัจจัยต่างๆ ต่อผลึกแคลเซียมออกซาเลตที่มีผลในกลไกการเกิดนิวไนโต
3. สร้างแบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตเรื้อรังและการเกิดพังผืดในไต โดยการเลี้ยงเซลล์ท่อไต เซลล์ไฟโบรพลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด และเหนี่ยวนำด้วยปัจจัยที่ต้องการศึกษา เช่น การใช้สารเคมี ยา หรือภาวะอื่นๆ

วิธีการดำเนินการ

- เลี้ยงเซลล์ท่อไตทั้งส่วนต้น (proximal) คือ HK-2 โดยใช้อาหาร DMEM medium (Gibco) ร่วมกับ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin G และ 100 µg/mL of streptomycin (Sigma) ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองต่อไป
- เลี้ยงเซลล์ท่อไตทั้งส่วนปลาย (distal and collecting duct) คือ MDCK โดยใช้อาหาร MEM medium (Gibco) ร่วมกับ 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL of penicillin G และ 100 µg/mL of streptomycin (Sigma) ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองต่อไป
- สร้างแบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตในท่อไต โดยการเลี้ยงเซลล์ท่อไตส่วนต้นและส่วนปลายในภาชนะพิเศษ คือ Transwell insert (polycarbonate membrane)
- สังเคราะห์ผลึกแคลเซียมออกซาเลต, แคลเซียมฟอสเฟต, แคลเซียมคาร์บอเนต และยูริก
- เก็บตัวอย่างโปรตีนทั้งในเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์อย่างเพียงพอ พร้อมทั้งตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างโดยวิธี Bradford's protein assay (Biorad) เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot analysis
- เก็บตัวอย่างเซลล์ท่อไตอย่างเพียงพอ พร้อมทั้งนับจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมสี Trypan blue จากนั้นนำไปนับจำนวนโดยใช้ Hemocytometer รวมทั้งมีการศึกษาการตาย และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ท่อไตหลังจากที่ถูกเกาะจับด้วยผลึกชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค Flow cytometry analysis
- ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS analysis และตรวจสอบและยืนยันผลด้วยวิธีการ Western blot analysis และ Immunofluorescent

- วิเคราะห์ผลการแสดงออกของโปรตีนโดยภาพรวม ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศเช่น UniProtKB (<http://www.expasy.org/sprot/>), Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER) bioinformatic tool (<http://www.pantherdb.org/>), Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) software (version 10) (<http://string-db.org/>)
- ทำการทดสอบผลของโปรตีนที่พบการเปลี่ยนแปลงต่อกระบวนการเกิดนิวไต์ของผลึกชนิดต่างๆ ที่พบในปัสสาวะ
- ทำการทดลองบทบาทสำคัญของปัจจัยต่างๆ ต่อกระบวนการเกิด การขยายขนาด การจับกลุ่ม และการยึดเกาะที่ผิวหน้าของเซลล์ท่อไต ของผลึกแคลเซียมออกซาเลต
- สร้างแบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตเรื้อรังและการเกิดพังผืดในไต โดยการเลี้ยงเซลล์ท่อไต เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด และเหนี่ยวนำด้วยปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยใช้การTGF- β 1, oxalate และภาวะ hypoxia
- วิเคราะห์และเรียบเรียงข้อมูลที่ได้เพื่อเตรียมต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลการดำเนินงาน

- สามารถสังเคราะห์ผลึกแคลเซียมออกซาเลต, แคลเซียมฟอสเฟต, แคลเซียมคาร์บอเนต และยูริก ที่ก่อโรคในไตได้สำเร็จ
- สามารถสร้างแบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตในท่อไต โดยการเลี้ยงเซลล์ท่อไตส่วนต้นและส่วนปลายในภาชนะพิเศษ คือ Transwell insert (polycarbonate membrane) ซึ่งเป็นรูปแบบการเลี้ยงเซลล์ท่อไตที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริงที่พบในร่างกายมนุษย์ได้สำเร็จ
- ได้ทำการทดสอบผลของโปรตีนที่พบการเปลี่ยนแปลงต่อกระบวนการเกิดนิวไต์ของผลึกชนิดต่างๆ ที่พบในปัสสาวะ
- ได้ทำการทดลองบทบาทสำคัญของปัจจัยต่างๆ ต่อกระบวนการเกิด การขยายขนาด การจับกลุ่ม และการยึดเกาะที่ผิวหน้าของเซลล์ท่อไต ของผลึกแคลเซียมออกซาเลต
- พบว่าโปรตีนในน้ำเลี้ยงมีผลยับยั้งการขยายขนาดของผลึกชนิดแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต แต่ไม่มีผลต่อกระบวนการเกิดผลึก และการเกาะกลุ่มของผลึก นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนตัวรับบางตัวที่ผิวเซลล์ซึ่งคาดว่าจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการยึดเกาะของผลึกบนผิวเซลล์
- พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนมากขึ้นและความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการจับของผลึกที่ผิวเซลล์ และเมื่อทำการ neutralize ผลการแสดงออกของโปรตีนนี้ที่ผิวเซลล์ด้วย anti- α -enolase พบว่าการจับของผลึกที่ผิวเซลล์ลดลง และเมื่อศึกษาตำแหน่งการจับของ α -enolase กับผลึกพบว่าโปรตีนจับกับผลึกที่ตำแหน่ง {121} > {100} > {010} และการจับระหว่าง α -enolase บนผลึกและผิวเซลล์ต้องอาศัย divalent cation ได้แก่ Mg^{2+}
- พบว่าโปรตีน plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 2 เกี่ยวข้องกับการกระบวนการเกิดนิวไต์ โดยสามารถยับยั้งโดยตรงกับผลึกชนิดแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต และทำหน้าที่เป็บตัวรับบนผิวเซลล์ซึ่งมีผลต่อการนำผลึกเข้าสู่เซลล์ท่อไตส่วนปลายได้
- สามารถระบุถึงวิธีการวิเคราะห์และดัชนีที่ดีและเหมาะสมในการศึกษาการเกาะกลุ่มของผลึก จำนวน 5 ดัชนีที่สามารถใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบกันได้อย่างเป็นระบบ คือ number of aggregates, aggregated mass index, optical density, aggregation coefficient and span
- พบว่าปัจจัยต่างๆ เช่น สารคาเฟอีน สภาวะกรด-เบส และภาวะเครียดออกซิเดชัน มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิด การขยายขนาด การจับกลุ่ม และการยึดเกาะที่ผิวหน้าของเซลล์ท่อไต ของผลึกแคลเซียมออกซาเลต

- สามารถแบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตเรื้อรังและการเกิดพังผืดในไต โดยการเหนี่ยวนำเซลล์ท่อไต เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดด้วย โดยใช้ TGF- β 1, oxalate และภาวะ hypoxia ได้สามารถยืนยันลักษณะของการเหนี่ยวนำให้เซลล์ท่อไตเปลี่ยนแปลงแบบ epithelial mesenchymal transition (EMT) โดยใช้ TGF- β 1, oxalate และภาวะ hypoxia ซึ่งนำไปสู่การเกิดพังผืดในไตได้ ทั้ง ลักษณะรูปร่างของเซลล์ (from cobblestone-like to fibroblast-like) การลดลงของโปรตีนที่เป็น epithelial marker (ZO-1) และการเพิ่มขึ้นของ mesenchymal marker (vimentin) ด้วยเทคนิค Western blot analysis, indirect immunofluorescence และ confocal microscopy
- ได้ตัวอย่างทั้งในเซลล์และน้ำเลี้ยงจาก แบบจำลองสำหรับการทดลองโรคไตเรื้อรังและการเกิดพังผืดในไต โดยการเหนี่ยวนำเซลล์ท่อไต เพื่อนำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนแบบด้วยเทคนิค Western blot analysis, indirect immunofluorescence, confocal microscopy, LC-MS/MS analysis
- วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปแบบองค์รวมจากการเกิดพังผืดในไต โดยการเหนี่ยวนำเซลล์ท่อไต เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดด้วย โดยใช้ TGF- β 1, oxalate และภาวะ hypoxia ด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศและชีวกลไกในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาในระดับโมเลกุล
- วิเคราะห์การแสดงออกในระดับเปปไทด์ของแบบองค์รวม จากการเกิดพังผืดในไตโดยการเหนี่ยวนำเซลล์ท่อไตโดยใช้ TGF- β 1 ด้วยเทคนิค Quantitative peptidomics using stable isotope labeling ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของ 70 unique endogenous peptides จากการเปลี่ยนแปลงให้เกิด EMT โดยพบว่าเปปไทด์ส่วนใหญ่นี้ถูกสร้างด้วยกระบวนการตัดด้วย proteasome โดยได้ทำการทดสอบสมมุติฐานนี้ ด้วยการใช้สารยับยั้งการทำงานของ proteasome คือ MG132 (a proteasome inhibitor) ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดลองตามสมมุติฐานได้ โดยพบการลดลงของเปปไทด์ที่ถูกตัดด้วย proteasome.

Output ที่ได้จากโครงการ

Quartile 1

1. Peerapen, P. and **Thongboonkerd V.** Caffeine prevents kidney stone formation by translocation of apical surface annexin A1 crystal-binding protein into cytoplasm: In vitro evidence. Sci Rep, 2016. 6:38536. Impact Factor : 5.228
2. Dounghawee G, Sutdan D, Niwatayakul K, Inwisai T, Sitthipunya A, Boonsathorn N, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic assay to detect serum anti-leptospiral lipopolysaccharide IgM in acute leptospirosis. Sci Rep. 2017;7(1): 2309. Impact Factor : 5.228
3. Manissorn J, Fong-Ngern K, Peerapen P, **Thongboonkerd V.** Systematic evaluation for effects of urine pH on calcium oxalate crystallization, crystal-cell adhesion and internalization into renal tubular cells. Sci Rep. 2017;7(1): 1798. Impact Factor : 5.228
4. Aluksanasuwan, S., et al., Role of HSP60 (HSPD1) in diabetes-induced renal tubular dysfunction: regulation of intracellular protein aggregation, ATP production, and oxidative stress. FASEB J. 2017 May;31(5):2157-2167. Impact Factor : 5.299
5. Amimanan P, Tavichakorntrakool R, Fong-Ngern K, Sribenjalux P, Lulitanond A, Prasongwatana V, et al. Elongation factor Tu on Escherichia coli isolated from urine of kidney stone patients promotes calcium oxalate crystal growth and aggregation. Sci Rep. 2017;7(1): 2953. Impact Factor : 5.228
6. Vinaiphath A, Aluksanasuwan S, Manissorn J, Sutthimethakorn S, **Thongboonkerd V.** Response of renal tubular cells to differential types and doses of calcium oxalate crystals: Integrative proteome

- network analysis and functional investigations. *Proteomics*. 2017 Aug;17(15-16). Impact Factor : 4.041
7. Aluksanasuwan S, Khamchun S, **Thongboonkerd V**. Targeted functional investigations guided by integrative proteome network analysis revealed significant perturbations of renal tubular cell functions induced by high-glucose. *Proteomics*. 2017 Sep;17(17-18). Impact Factor : 4.041
 8. Fong-Ngern, K., et al., Prolonged K⁺ deficiency increases intracellular ATP, cell cycle arrest and cell death in renal tubular cells. *Metabolism*, 2017 Sep;74:47-61. Impact Factor : 4.375
 9. Tosukhowong P, Kulpradit P, **Chaiyarit S**, Ungjareonwattana W, Kalpongnukul N, Ratchanon S, et al. Lime powder treatment reduces urinary excretion of total protein and transferrin but increases uromodulin excretion in patients with urolithiasis. *Urolithiasis*. 2018 Jun;46(3):257-264. Impact Factor : 1.816
 10. Thanomkitti K, **Kanlaya R**, Fong-Ngern K, Kapincharanon C, Sueksakit K, Chanchaem P, et al. Differential proteomics of lesional vs. non-lesional biopsies revealed non-immune mechanisms of alopecia areata. *Sci Rep*. 2018;8(1):521. Impact Factor : 4.122
 11. Singhto N, **Kanlaya R**, Nilnumkhum A, **Thongboonkerd V**. Roles of Macrophage Exosomes in Immune Response to Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Front Immunol*. 2018;9:316. Impact Factor : 5.511
 12. Vinaiphat A, **Thongboonkerd V**. Characterizations of PMCA2-interacting complex and its role as a calcium oxalate crystal-binding protein. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(8):1461-82. Impact Factor : 6.721
 13. Singhto N, **Thongboonkerd V**. Exosomes derived from calcium oxalate-exposed macrophages enhance IL-8 production from renal cells, neutrophil migration and crystal invasion through extracellular matrix. *J Proteomics*. 2018;185:64-76. Impact Factor : 3.722
 14. Peerapen P, **Thongboonkerd V**. Caffeine in Kidney Stone Disease: Risk or Benefit? *Adv Nutr*. 2018;9(4):419-24. Impact Factor : 6.853
 15. Kanlaya R, **Thongboonkerd V**. Protective Effects of Epigallocatechin-3-Gallate from Green Tea in Various Kidney Diseases. *Adv Nutr*. 2019 Jan 1;10(1):112-121. Impact Factor : 6.853
 16. Khamchun S, Sueksakit K, Chaiyarit S, **Thongboonkerd V**. Modulatory effects of fibronectin on calcium oxalate crystallization, growth, aggregation, adhesion on renal tubular cells, and invasion through extracellular matrix. *J Biol Inorg Chem*. 2019 Mar;24(2):235-246. Impact Factor : 2.952
 17. Sueksakit K, **Thongboonkerd V**. Protective effects of finasteride against testosterone-induced calcium oxalate crystallization and crystal-cell adhesion. *J Biol Inorg Chem*. 2019. [Epub ahead of print] Impact Factor : 3.632
 18. Chanthick C, **Thongboonkerd V**. Comparative proteomics reveals concordant and discordant biochemical effects of caffeine versus epigallocatechin-3-gallate in human endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;378:114621. Impact Factor : 3.585

Quartile 2

1. Vinaiphat A, **Thongboonkerd V**. Prospects for proteomics in kidney stone disease. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(3):185-7. Impact Factor : 3.849
2. Kapincharanon C, **Thongboonkerd V**. K(+) deficiency caused defects in renal tubular cell proliferation, oxidative stress response, tissue repair and tight junction integrity, but enhanced

- energy production, proteasome function and cellular K(+) uptake. *Cell Adh Migr.* 2017;1-12.
Impact Factor : 3.566
3. Chaiyarit S, **Thongboonkerd V.** Defining and Systematic Analyses of Aggregation Indices to Evaluate Degree of Calcium Oxalate Crystal Aggregation. *Front Chem.* 2017;5:113. Impact Factor : 4.155
 4. Peerapen P, Chaiyarit S, **Thongboonkerd V.** Protein Network Analysis and Functional Studies of Calcium Oxalate Crystal-Induced Cytotoxicity in Renal Tubular Epithelial Cells. *Proteomics.* 2018;18(8):e1800008. Impact Factor : 3.532
 5. Vinaiphat A, **Thongboonkerd V.** Chaperonomics in leptospirosis. *Expert Rev Proteomics.* 2018 Jul;15(7):569-579. Impact Factor : 3.489
 6. Chularojanamontri L, Wongpraparut C, Silpa-Archa N, **Peerapen P**, Boonmark W, Kulthanan K, et al. The humoral immunity to epidermal and dermal antigens in psoriasis: a downstream rather than an upstream event. *Clin Exp Med.* 2018 Aug;18(3):453-456. Impact Factor : 2.787
 7. Manissorn J, Singht N, **Thongboonkerd V.** Characterizations of HSP90-Interacting Complex in Renal Cells Using Tandem Affinity Purification and Its Potential Role in Kidney Stone Formation. *Proteomics.* 2018;18(24):e1800004. Impact Factor : 3.532
 8. Chularojanamontri L, Charoenpipatsin N, Silpa-Archa N, Wongpraparut C, **Thongboonkerd V.** Proteomics in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 6;20(5). pii: E1141. Impact Factor : 4.183

Quartile 3

1. Kaewarpai T, **Thongboonkerd V.** High-glucose-induced changes in macrophage secretome: regulation of immune response. *Mol Cell Biochem.* 2019 Feb;452(1-2):51-62. Impact Factor : 2.561
2. Nilnumkhum A, Kanlaya R, Yoodee S, **Thongboonkerd V.** Caffeine inhibits hypoxia-induced renal fibroblast activation by antioxidant mechanism. *Cell Adh Migr.* 2019 Dec;13(1):260-272. Impact Factor : 3.296
3. Soongsathitanon J, Umsa-Ard W, **Thongboonkerd V.** Proteomic analysis of peripheral blood polymorphonuclear cells (PBMCs) reveals alteration of neutrophil extracellular trap (NET) components in uncontrolled diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2019. [Epub ahead of print] Impact Factor : 2.884

Dengue Hemorrhagic Fever Research

หลักการและเหตุผล

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก รวมทั้งประเทศไทย สถานการณ์โรคไข้เลือดออก ในปัจจุบันนั้นพบว่าการแพร่กระจายและเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยและจำนวนผู้ที่เสียชีวิตอย่างต่อเนื่องในช่วงตลอดระยะเวลาสิบกว่าปีที่ผ่านมา ในปีหนึ่งๆ จะมีผู้ติดเชื้อสูงถึงประมาณ 390 ล้านคน และมีผู้ติดเชื้อที่มีอาการป่วยประมาณ 96 ล้านคน ในส่วนของประเทศไทยในปีหนึ่งๆ มีผู้ป่วยโดยเฉพาะในกลุ่มวัยเด็กล้มป่วยเป็นจำนวนมากและมีจำนวนไม่น้อยที่มีอาการรุนแรงจนเสียชีวิต ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข สังคม เศรษฐกิจ เป็นอย่างมาก โรคไข้เลือดออกเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue virus) ซึ่งมีทั้งหมด 4 ชนิด (serotype) คือ ซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4 ลักษณะอาการของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะมีความหลากหลาย ส่วนใหญ่จะเป็นแบบไม่มีการแสดงอาการของโรคภายหลังการติดเชื้อ (asymptomatic) ประมาณ 10% จะแสดงอาการไข้ที่ไม่รุนแรงหายเองได้ในเวลาไม่กี่วัน (dengue fever, DF) และมีกลุ่มที่แสดง

กลุ่มอาการที่มีการรั่วของพลาสมาออกนอกหลอดเลือด หรือโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever / dengue shock syndrome, DHF/DSS) ซึ่งในกลุ่มที่อาการรั่วของพลาสมาออกนอกหลอดเลือดนั้นอาการรุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคนี้คือ ภาวะที่มีการรั่วของสารน้ำออกนอกหลอดเลือด (vascular leakage), มีการลดลงอย่างมากของจำนวนเกล็ดเลือด (thrombocytopenia) รวมทั้งการมีภาวะเลือดออกผิดปกติ (bleeding diathesis) ในอวัยวะต่างๆ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ผิวหนัง เยื่อบุตา เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบความผิดปกติในการทำงานของตับ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) รวมถึงมีการหลั่ง cytokines และ chemokines ที่ทำให้เกิดภาวะการอักเสบอย่างรุนแรง (cytokine storm) สาเหตุหรือพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ที่ทำให้เกิดภาวะความผิดปกติที่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียารักษาโรคที่จำเพาะสำหรับการติดเชื้อไวรัสเด็งกี และในส่วนของวัคซีนป้องกันโรคนี้ มีวัคซีนของบริษัท Sanofi Pasteur ซึ่งผ่านการทดสอบทางคลินิกในระยะที่ 3 แล้วในกลุ่มประชากรที่มีอายุระหว่าง 2 ถึง 16 ปี พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ประมาณ 56.5% ในกลุ่มตัวอย่างประชากรทวีปเอเชีย และ 60.8% ในกลุ่มตัวอย่างประชากรทวีปอเมริกาเท่านั้น ผลการวิเคราะห์ล่าสุดพบว่าวัคซีนมีความสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี แต่มีประสิทธิภาพต่ำในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี และโดยเฉพาะในกลุ่มเด็กที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเด็งกีมาก่อน (seronegative) นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ที่ได้รับวัคซีนที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี มีโอกาสเกิดโรคที่รุนแรงและต้องรับการรักษาในโรงพยาบาลมากกว่าซึ่งสาเหตุยังไม่เป็นที่แน่ชัด

ปัจจุบันกลไกการเกิดความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีรายใดจะเกิดอาการโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง ดังนั้นแพทย์จะต้องดูแลผู้ป่วยที่พบการติดเชื้ออย่างใกล้ชิดเพื่อลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย ที่สำคัญในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อที่มีเพียงอาการไข้สูง ลักษณะอาการทางคลินิกและผลตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการพื้นฐานไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยจะมีการพัฒนาไปสู่อาการรุนแรงหรือไม่ แพทย์ต้องดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิดเพราะหากไม่ได้รับการดูแลรักษาที่เหมาะสมและทันท่วงที ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ ดังนั้นความรู้ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรค รวมถึงการมีวิธีการหรือชุดตรวจที่บ่งชี้ภาวะการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและสามารถพยากรณ์การเกิดความรุนแรงของโรคได้ตั้งแต่ช่วงระยะแรกที่มีอาการไข้นั้น จะช่วยให้แพทย์หรือบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุขสามารถติดตามผู้ป่วยได้อย่างใกล้ชิด รวมถึงให้การรักษาได้อย่างเหมาะสมและทันท่วงที ซึ่งเป็นการช่วยลดอัตราการป่วยตายได้และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายที่ต้องเสียไปกับการดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาลได้

สาเหตุของการเกิดพยาธิกำเนิดของการเกิดความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่อาการความผิดปกติที่พบในคนไข้ที่ติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงที่สำคัญ คือความผิดปกติในการทำงานของตับ มีระดับเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine transferase (ALT) ที่เพิ่มสูงขึ้น, มีอาการปวดท้อง, มีภาวะตับโต (Hepatomegaly) ซึ่งบ่งบอกถึงที่ความผิดปกติเกิดขึ้นกับตับ ที่สำคัญอย่างยิ่งจากผลงานวิจัยที่มีมาในอดีต และจากคณะผู้วิจัยบ่งชี้ถึงการเกิดพยาธิสภาพในตับ โดยพบว่าตับของคนไข้เสียชีวิตด้วยโรคไข้เลือดออกจะตรวจพบการตาย (Apoptosis และ Necrosis), ตรวจพบ complement fragment proteins ที่เซลล์ตับ ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงการมีพยาธิสภาพที่ตับ นอกจากนั้นยังสามารถตรวจพบโปรตีนของไวรัสเด็งกี พบโปรตีนที่บ่งชี้ว่าไวรัสเด็งกีสามารถเพิ่มจำนวนได้ คือโปรตีน Nonstructural protein 3 (NS3) และ DENV viral RNA ได้จากชิ้นเนื้อตับ จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าตับเป็นอวัยวะสำคัญหนึ่งที่ไวรัสเด็งกีสามารถเพิ่มจำนวนได้ ความรู้ความเข้าใจกระบวนการเกิดการติดเชื้อไวรัสเด็งกี รวมถึงการตอบสนองของเซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ อาจนำไปสู่ความเข้าใจการเกิดพยาธิสภาพที่พบในคนไข้ที่มีอาการรุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและการตอบสนองของเซลล์ตับโดยใช้ primary hepatocyte จะเป็นสิ่งที่ดีที่สุด แต่ primary hepatocyte มีราคาค่อนข้างสูง และอาจมี variation ของการตอบสนองที่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้เซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกับ primary hepatocyte จะทำให้ได้ผล

การศึกษาที่น่าเชื่อถือ สืบเนื่องจากทีมงานวิจัยของ ศ.นพ.สุรเดช หงษ์อิง ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ได้สร้างเซลล์ตับ Immortalized hepatocyte like-cells (imHC) และได้ทำการศึกษาพบว่าเซลล์ดังกล่าวมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ primary hepatocyte นอกจากนั้นแล้วยังมีการศึกษาแล้วว่าเป็นเซลล์ target ที่ดีสำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงนำเซลล์ชนิดนี้มาทดสอบกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้วิจัยเริ่มต้นด้วยการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ imHC กับ hepatocyte cell lines ชนิดอื่นๆ (HepG2 และ Huh-7) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อไวรัสตับอักเสบบีในปัจจุบัน ซึ่งเซลล์ HepG2 และ Huh-7 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็ง การมีเซลล์ตับที่ใกล้เคียงกับ primary hepatocyte จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงกลไกการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมถึงการตอบสนองของเซลล์ตับเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และยังสามารถนำเซลล์ชนิดนี้เพื่อทำการศึกษาการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการได้เช่นกัน องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ อาจจะไปสู่ความรู้เข้าใจถึงการเกิดพยาธิสภาพของตับและนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคไขมันพอกตับ การทราบถึงปัจจัยหรือกลไกที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดโรคซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนใหม่เพื่อการดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์หลัก

ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ตับต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้เซลล์ตับที่สร้างจากการกระตุ้นสเต็มเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ตับของมนุษย์ และเป็นเซลล์ที่เลี้ยงให้เติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง (Immortalized Hepatocyte-like cells; imHC) และใช้เซลล์นี้เป็น target cell model ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเซลล์ตับ imHC นี้เป็นเซลล์ที่สร้างมาโดยกลุ่มงานวิจัยของ ศ.นพ.สุรเดช หงษ์อิง ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และผ่านการทดลองแล้วว่ามีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ตับ

วัตถุประสงค์ย่อย

1. ศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ imHC กับ hepatocyte cell lines สองชนิด คือ HepG2 และ Huh-7 ที่ใช้กันอยู่ในห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็ง โดยจะเปรียบเทียบในแง่ของคุณสมบัติในการจับกับไวรัสตับอักเสบบีและการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ตับซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสตับอักเสบบี (DENV receptors)
2. ศึกษาการตอบสนองต่อไวรัสของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV 1-4) โดยใช้สายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory strains) และสายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือดของผู้ป่วยโรคไขมันพอกตับ (Clinical isolates)
3. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลของเซลล์ตับ (imHC และเซลล์ตับชนิดอื่นๆ) และทำการการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ lipid droplets และปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับ เมื่อมีการตอบสนองต่อไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี Mass Spectrometry

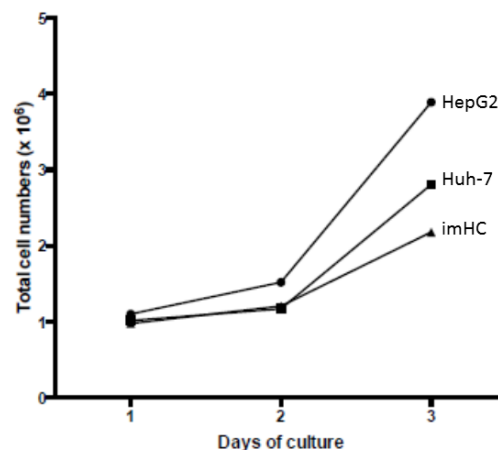
วิธีการดำเนินการ และผลการดำเนินงาน

1. พัฒนาระบบที่ใช้เลี้ยงเซลล์ตับที่สร้างจากการกระตุ้นสเต็มเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ตับของมนุษย์ (Immortalized hepatocyte like-cells; imHC) และใช้เซลล์นี้เป็น target cell model ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เซลล์ตับ imHC เป็นเซลล์ที่สร้างมาโดยกลุ่มงานวิจัยของ ศ.นพ.สุรเดช หงษ์อิง ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และผ่านการทดลองแล้วว่าเป็นเซลล์ target ที่ดีสำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทางหน่วยวิจัยโรคไขมันพอกตับจึงนำเซลล์ชนิดนี้มาทดสอบกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้วิจัยเริ่มต้นด้วยการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ imHC กับ hepatocyte cell lines ชนิดอื่นๆ

(HepG2 และ Huh-7) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อไวรัสเด็งกีในปัจจุบัน ซึ่งเซลล์ HepG2 และ Huh-7 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็ง

1.1 ศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ imHC

ในระยะเริ่มต้นทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ imHC กับเซลล์ต้นที่เป็น cell lines คือ HepG2 และ Huh-7 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวใน 6-well plate ที่ปริมาณเซลล์จำนวนเท่ากันคือ 0.8×10^5 เซลล์ต่อ well หลังจากนั้นที่เวลาต่างๆ จึงทำการนับปริมาณเซลล์ในแต่ละ well โดยใช้ Hematocytometer จากผลการทดลองนี้พบว่า เซลล์ imHC มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับ Huh-7 มากกว่า HepG2 แต่โดยรวมแล้วไม่แตกต่างกันดังแสดงใน รูปที่ 1



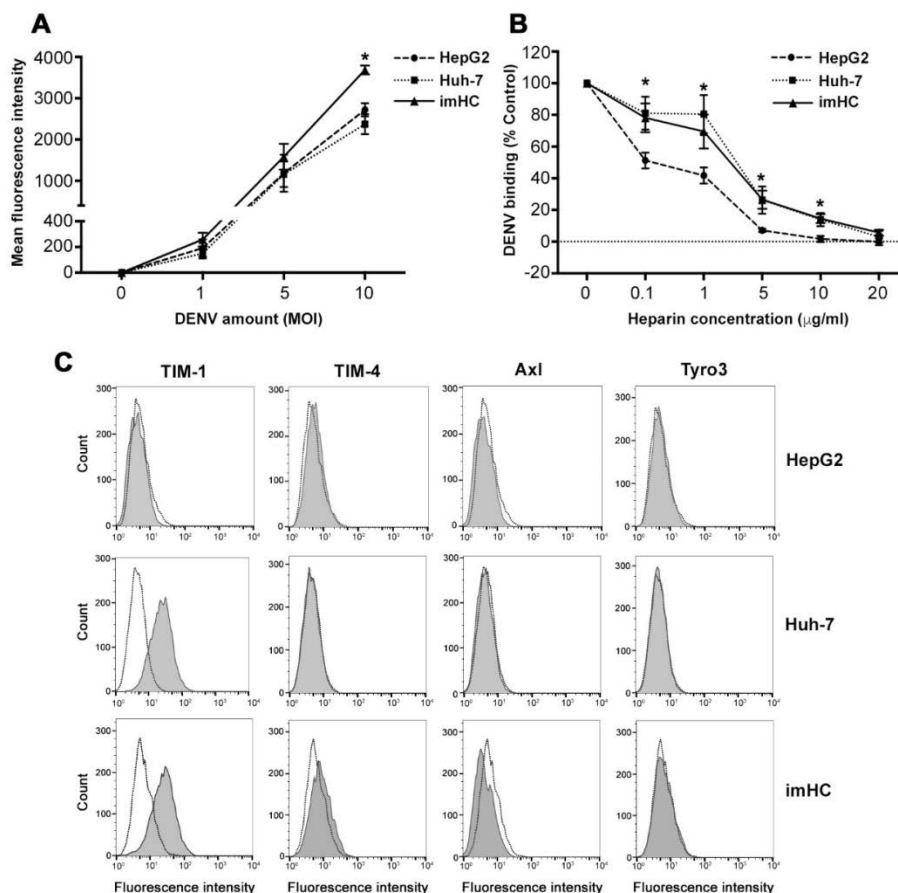
รูปที่ 1 อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นสามชนิดคือ imHC HepG2 และ Huh-7 (ข้อมูลที่แสดงในรูปมาจากการทดลองซ้ำสองครั้ง)

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบการจับกับเชื้อไวรัสและการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสเด็งกี (DENV receptors) ของ imHC และเซลล์ต้นอีกสองชนิด

คุณสมบัติที่สำคัญของ hepatocyte cell model สำหรับการศึกษาการตอบสนองของเชื้อไวรัสเด็งกีคือความสามารถในการจับกับไวรัสผ่านทาง DENV receptors ที่อยู่บนผิวเซลล์ ก่อนที่ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองเปรียบเทียบเพื่อศึกษาว่า imHC และเซลล์ต้นอีกสองชนิดมีความสามารถในการจับกับไวรัสเด็งกีได้เท่าเทียมกันหรือไม่ โดยทำการทดลองโดยใช้ไวรัสเด็งกีที่ปริมาณต่างๆกัน คือปริมาณเชื้อไวรัสเด็งกีต่อเซลล์ (Multiplicity of infection /MOI) ที่ 0, 1, 5 และ 10 มาบ่มกับเซลล์ต้นทั้งสามชนิดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างไวรัสที่ไม่จับกับเซลล์ออก จากนั้นตรวจวัดปริมาณไวรัสบนผิวเซลล์โดยวิธี immunofluorescence โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้าง (Envelope protein, E) ของไวรัส และวิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่า เซลล์ต้นทั้งสามชนิดมีความสามารถในการจับกับไวรัสเด็งกีได้ใกล้เคียงกัน แต่ในปริมาณไวรัสที่สูงคือ MOI of 10 จะพบว่าเซลล์ imHC นั้นจะจับกับไวรัสได้ดีกว่า HepG2 และ Huh-7 อย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 2A

เนื่องจากเคยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าโปรตีนที่มี heparan sulfate ทำหน้าที่หลักในการจับกับไวรัสเด็งกีในเซลล์ Huh-7 (7, 8) เราจึงทำการเปรียบเทียบบทบาท heparan sulfate ในการจับกับไวรัสเด็งกีของเซลล์ต้นทั้งสามชนิดนี้ โดยใช้ heparin ซึ่งเป็น analog ของ heparan sulfate มายับยั้งการจับของไวรัสกับ heparan sulfate บนผิวเซลล์ โดยใช้ปริมาณของ heparin ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) มาบ่มกับเซลล์ต้นทั้งสามชนิดและ

ไวรัสที่ MOI of 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างไวรัสที่ไม่จับกับเซลล์ออก และตรวจวัดปริมาณไวรัสบนผิวเซลล์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่า heparin สามารถยับยั้งการจับของไวรัสบนผิวเซลล์ได้แบบแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ (dose-dependent inhibition) และที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการจับของไวรัสบนผิวเซลล์ทั้งสามชนิดได้ 100% ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นเดียวกันของ heparin จะสามารถยับยั้งการจับของไวรัสบนผิวเซลล์ HepG2 ได้ดีกว่าเซลล์อีกสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2B ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการจับของไวรัสบนผิวเซลล์ HepG2 ขึ้นอยู่กับ heparan sulfate มากกว่าเซลล์อีกสองชนิด หรือเป็นไปได้ว่า เซลล์อีกสองชนิดมีการแสดงออกของโปรตีนอื่นที่มีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสเด็งกี เราจึงทำการทดลองต่อโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ DENV receptors อื่นๆที่เคยมีรายงานมาว่ามีบทบาทในการจับกับไวรัสเด็งกี เช่น T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) and 4 (TIM-4), Axl and Tyro3 (Dtk) ซึ่งอยู่ในตระกูลของ TAM (Tyro3-Axl-Mer) receptor family (9) มาตรวจสอบปริมาณของโปรตีนเหล่านี้บนผิวเซลล์ด้วยวิธี immunofluorescence and flow cytometry และผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่า เซลล์ imHC และ Huh-7 มีการแสดงออกของ TIM-1 อย่างชัดเจน ในขณะที่เซลล์ HepG2 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ นอกจากนี้ imHC ยังมี TIM-4 ในระดับต่ำๆ แต่ไม่พบในเซลล์อีกสองชนิด และไม่พบว่ามี Axl and Tyro3 ในเซลล์ทั้งสามชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2C

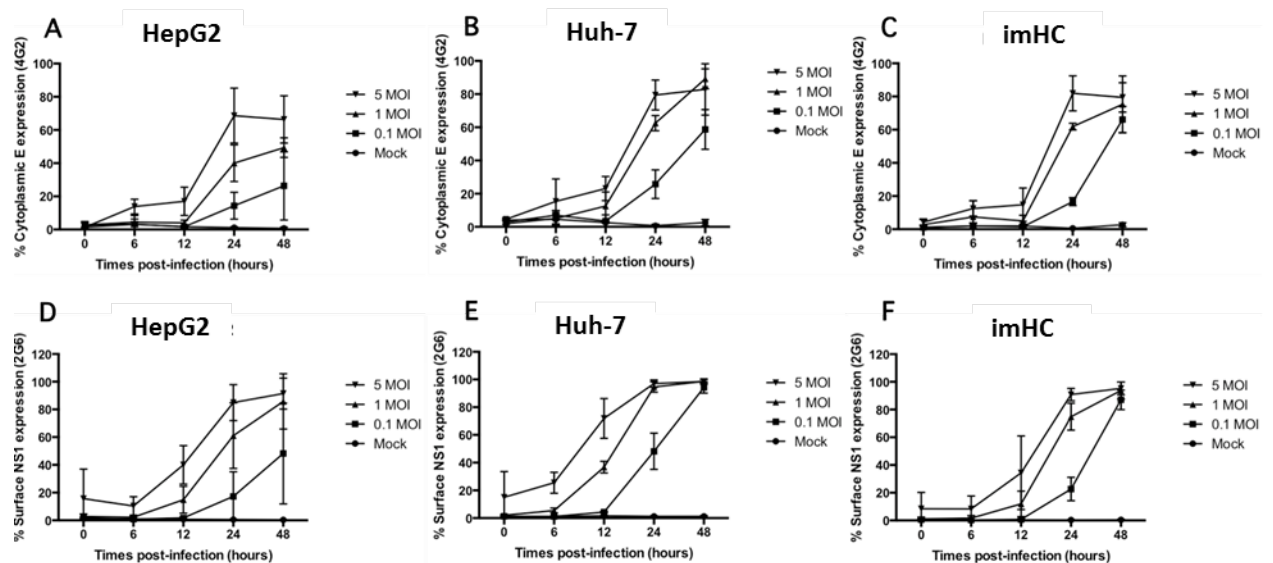


รูปที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบการจับกับเชื้อไวรัสและการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสเด็งกี (DENV receptors) ของ imHC, HepG2 และ Huh-7 cells (รูปที่แสดงใน A และ B คือค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

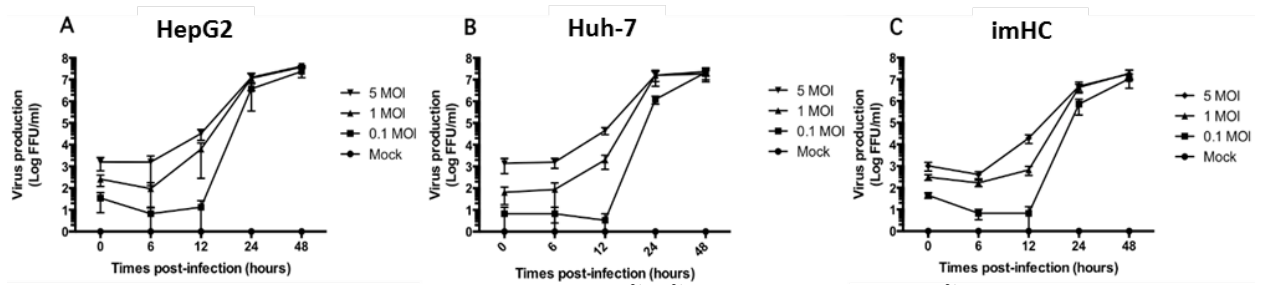
2. ศึกษาการตอบสนองต่อไวรัสของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกีทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV 1-4) โดยใช้สายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory strains) และสายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือดของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (Clinical isolates)

2.1 ทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อของไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) ในเซลล์ตับ imHC กับเซลล์ตับที่เป็น cell lines คือ HepG2 และ Huh-7

เซลล์ตับทั้งสามชนิดถูกทำให้ติดเชื้อ DENV-2 โดยใช้ปริมาณเชื้อที่แตกต่างกัน คือ Multiplicity of infection (MOI) ที่ 0.1, 1 และ 5 หลังจากการติดเชื้อเป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดการติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยตรวจหาโปรตีนของไวรัสในเซลล์ด้วยเทคนิค cytoplasmic staining โดยใช้ Antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเปลือกหุ้ม (Envelope protein; E) และเทคนิค surface staining โดยใช้ Antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนซึ่งไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างของไวรัส, Non-structural protein 1 (NS1) แล้วตรวจวิเคราะห์ผลโดยใช้ Flow cytometry นอกจากนั้นตรวจวัดปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus forming unit จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า อัตราการติดเชื้อ DENV-2 ในเซลล์ตับทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งการแสดงออกของโปรตีน E ในเซลล์ที่ติดเชื้อ และการแสดงออกของโปรตีน NS1 บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อมีแสดงใน **รูปที่ 3** ในส่วนของน้ำเลี้ยงพบว่า ปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ทั้งสามชนิดนั้นไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงใน **รูปที่ 4**



รูปที่ 3 การแสดงออกของโปรตีน E ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี (A-C) และการแสดงออกของโปรตีน NS1 (D-F) บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ DENV-2 ในเซลล์ตับสามชนิด HepG2, Huh-7 และ imHC (ข้อมูลที่แสดงในรูปมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)



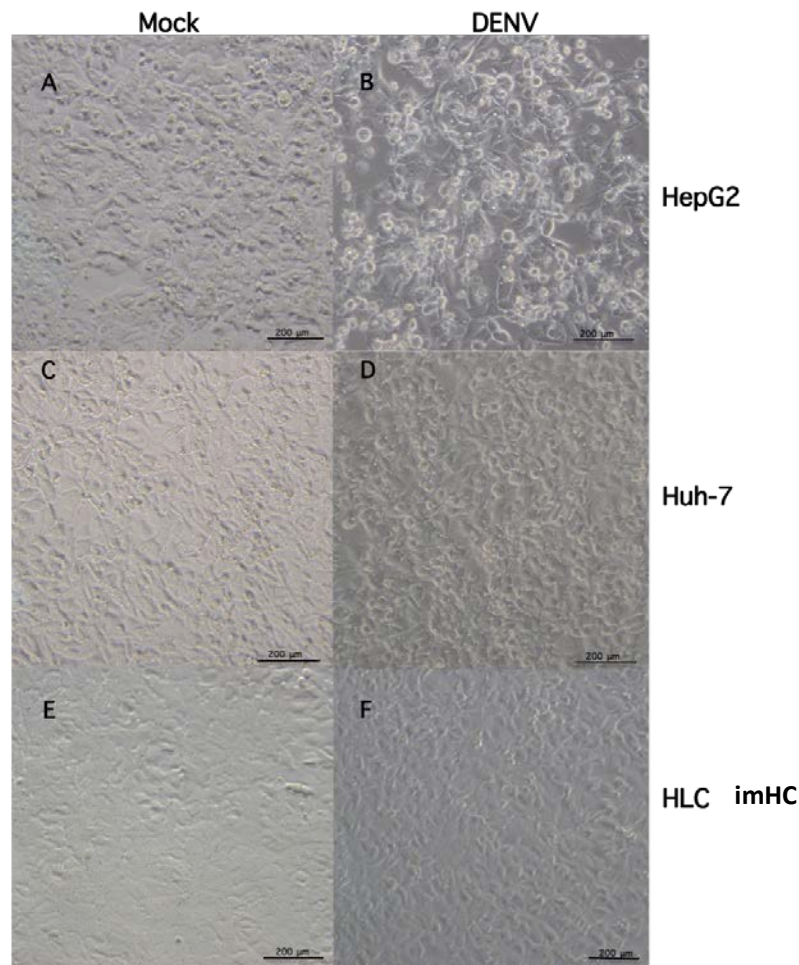
รูปที่ 4 แสดงปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สองในเซลล์ตับสามชนิด HepG2, Huh-7 และ imHC (ข้อมูลที่แสดงในรูปมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

2.2 ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตายของเซลล์ หลังจากเกิดการติดเชื้อของไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) ในเซลล์ตับ imHC กับเซลล์ตับที่เป็น cell lines คือ HepG2 และ Huh-7

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตายของเซลล์ตับทั้งสามชนิด (HepG2, Huh-7 และ imHC) ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ DENV-2 ที่ MOI 0.1, 1 และ 5 และที่ช่วงเวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อตามเวลาดังกล่าว ทำการตรวจวัดการตายของเซลล์ โดยย้อมด้วย Propidium iodide (PI) ซึ่งจะสามารถเข้าไปจับกับสาย DNA ของเซลล์ตาย แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Flow cytometry พบว่าอัตราการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ทั้งสามชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าในเซลล์ HepG2 จะพบมีการตายที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในเซลล์ Huh-7 และ imHC ดังแสดงในรูปที่ 5 นอกจากนี้ลักษณะและรูปร่างของเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีมาแล้ว 48 ชั่วโมงนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เซลล์ตับอีกสองชนิดคือ imHC และ Huh-7 ไม่ได้แสดงลักษณะหรือรูปร่างที่แตกต่างกันมากในช่วงก่อนและหลังติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 แสดงอัตราการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สองในเซลล์ตับสามชนิด HepG2, Huh-7 และ imHC (ข้อมูลที่แสดงในรูปมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)



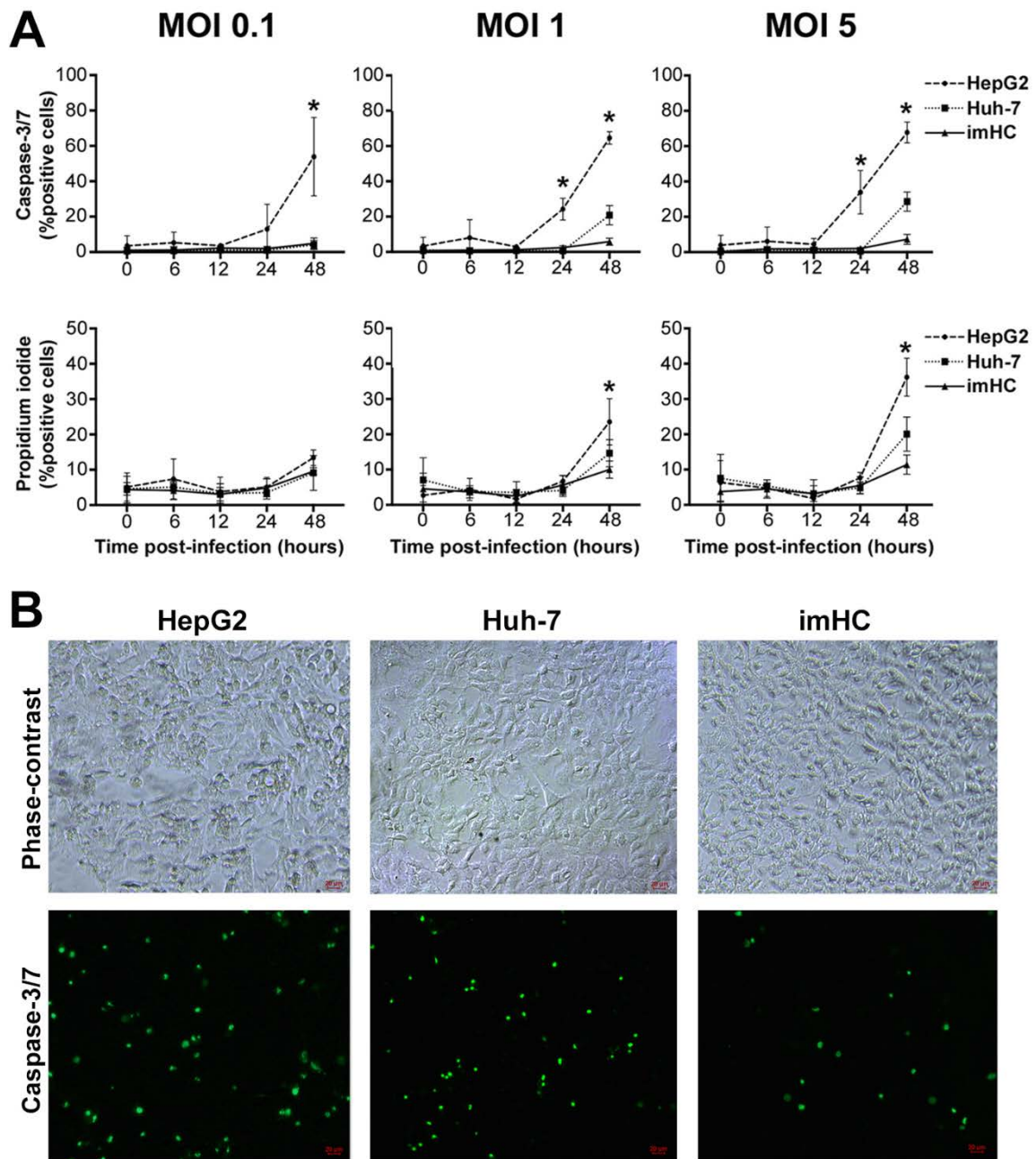
รูปที่ 6 ลักษณะของเซลล์ที่ดับที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีที่ MOI 5 มาแล้ว 48 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อในเซลล์ดับทั้งสามชนิด คือ HepG2 Huh-7 และ imHC (ภาพที่แสดงในรูป เป็นตัวแทนของภาพจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

2.3 ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) ในเซลล์ดับ imHC กับเซลล์ดับที่เป็น cell lines สองชนิดคือ HepG2 และ Huh7

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า DENV-2 สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ imHC ได้ดีและอัตราการเพิ่มปริมาณของ DENV-2 ในเซลล์ดับ imHC นั้น ไม่แตกต่างไปจากเซลล์ hepatocyte cell lines อีกสองชนิด (Huh7 และ HepG2) โดยตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน E ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีและการแสดงออกของโปรตีน NS1 บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ รวมถึงการปล่อยไวรัสออกมาใน ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ จากรายงานการศึกษาในอดีตพบว่า hepatocyte cell lines (Huh7 และ HepG2) เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี เซลล์จะถูกกระตุ้นและตรวจพบการการตายของเซลล์ คือเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะพบการตายแบบ Apoptosis (10- 13) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบอัตราการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อ DENV-2 ในเซลล์ดับทั้งสามชนิด โดยเซลล์ดับทั้งสามชนิดถูกทำให้ติดเชื้อ DENV-2 โดยใช้ปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันไป คือ Multiplicity of infection (MOI) ที่ 0.1, 1 และ 5 หลังจากทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรวจวัด Caspase-3/7 activity โดยย้อมด้วย CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Flow cytometry และได้ทำการตรวจวัดควบคู่กับการย้อมด้วย PI แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Flow cytometry พบว่าอัตราการตายแบบ Apoptosis จากการตรวจวัด Caspase-3/7 activity และการย้อมด้วย PI มีความสอดคล้องกัน โดยในเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะพบว่าการตายที่

เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในเซลล์ Huh7 และ imHC ในทุกปริมาณเชื้อไวรัสเด็งกีที่แตกต่างกัน (MOI 0.1, 1 และ 5) และในเซลล์ HepG2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อที่ MOI 1 และ MOI 5 จะพบการตายแบบ Apoptosis ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า Huh7 และ imHC อย่างมีนัยสำคัญที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 7A

นอกจากนั้นแล้วทำการยืนยันผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดย Flow cytometry ด้วยวิธี Immunofluorescence โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับทั้งสามชนิดแบบ Adherent โดยเพาะเลี้ยงใน 8-well chambered slides จากนั้นทำให้ติดเชื้อ DENV-2 โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ MOI 5 หลังจากทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวัดการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรวจวัด Caspase-3/7 activity โดยย้อมด้วย CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้กล้อง Inverted fluorescence microscope พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกันกับผลการวิเคราะห์โดยใช้ Flow cytometry คือเซลล์ที่มีการตายแบบ Apoptosis (เซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียว) ในเซลล์ HepG2 มีจำนวนมากกว่า Huh7 และ imHC ดังแสดงในรูปที่ 7B

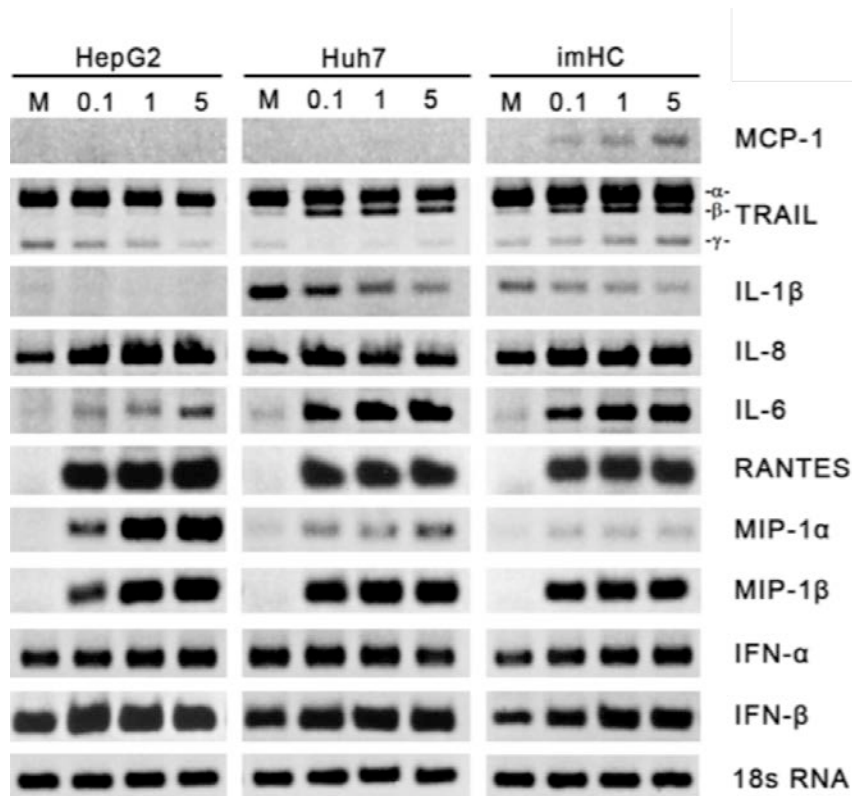


รูปที่ 7 แสดงอัตราการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สองในเซลล์ตับสามชนิด HepG2, Huh7 และ imHC

ผลของการวิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์ทั้งสามชนิดหลังจากที่ทำการติดเชื้อ DENV-2 (MOI 0.1, 1, 5) ในระยะเวลาต่างๆกัน โดยตรวจวัด Caspase-3/7 activity โดยย้อมด้วย CellEvent TM Caspase-3/7 Green Detection Reagent และย้อมด้วย PI แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ติดสีย้อมโดยใช้ Flow cytometry (ข้อมูลที่แสดงในรูป 7A มาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง) และ ทำการยืนยันผลอัตราการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์ โดยทำการบันทึกภาพของเซลล์ที่ย้อมด้วย CellEvent TM Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Positive Caspase-3/7 staining) ด้วย กล้อง fluorescence microscope (ตัวแทนภาพของการวิเคราะห์ ดังแสดงในรูป 7B)

2.4 ศึกษาเปรียบเทียบการสร้าง cytokines ที่สนใจในระดับ RNA ในการตอบสนองของเซลล์เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) ในเซลล์ตับทั้งสามชนิด คือ HepG2, Huh7 และ imHC

เซลล์ตับทั้งสามชนิด คือ HepG2, Huh7 และ imHC ถูกทำให้ติดเชื้อ DENV-2 ที่ MOI 0.1, 1 และ 5 หลังถูกทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ที่ติดเชื้อจากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย DMEM-F-12 medium แล้วนับจำนวนเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ในปริมาณที่เท่ากันจากเซลล์ทั้งสามชนิด (จำนวน $0.5-1.0 \times 10^6$ เซลล์) มาทำการสกัด RNA โดยใช้เทคนิค Trizol extraction และตรวจวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้โดยวิธี Nanodrop และนำปริมาณ RNA ที่เท่ากันจากเซลล์ทั้งสามชนิดมาทำการตรวจหาการแสดงออกของยีน cytokines ที่สนใจ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่ง cytokines ที่เราสนใจมี 10 ชนิด ดังนี้ MCP-1, TRAIL, IL-1, IL-6, IL-8, RANTES, IFN- α , IFN- β , MIP-1 α และ MIP-1 β โดยใช้ gene 18S เป็นตัวควบคุมในเชิงปริมาณ สาเหตุที่เราเลือก cytokines ชุดนี้มาทำการศึกษา เพราะมีรายงานก่อนหน้านี้ที่บอกถึงการแสดงออกของ cytokines เหล่านี้ในเซลล์ primary hepatocyte (14) และจากผลการศึกษาของเราพบว่าเซลล์ตับทั้งสามชนิดมีการตอบสนองและมีระดับการแสดงออกของ cytokine แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยเซลล์ตับทั้งสามชนิดจะมีการแสดงออกของระดับ RNA ของ IL-8, IL-6, RANTES, MIP-1 β , IFN- β และ IFN- α ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและเพิ่มขึ้นตามปริมาณไวรัสที่ติดเชื้อที่น่าสนใจคือในเซลล์ imHC เมื่อติดเชื้อไวรัสเด็งกีแล้วจะมีการแสดงออกของระดับ RNA ของ MCP-1 ที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้านี้ในเซลล์ Primary hepatocyte แต่ใน hepatocyte cell lines อีกสองชนิด คือ Huh7 และ HepG2 ไม่พบว่าการแสดงออกของ MCP-1 นอกจากนั้นแล้วในเซลล์ imHC และ Huh7 จะมีการสร้าง IL-1 β แต่ไม่พบในเซลล์ HepG2 เลย ผลจากการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ imHC นั้นมีความใกล้เคียงกับ Primary hepatocyte ในแง่ของการสร้าง cytokines มากกว่าเซลล์อีกสองชนิด

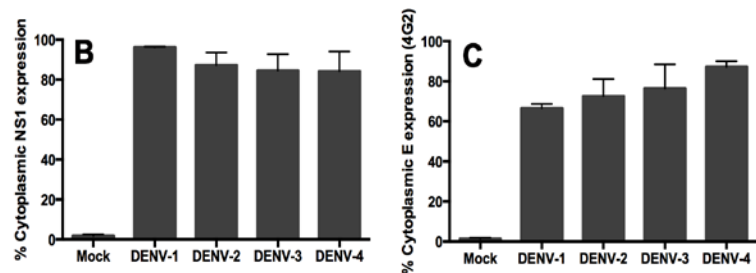


รูปที่ 8 การแสดงออกของ cytokines ในการตอบสนองของเซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ DENV-2 ในเซลล์ตับทั้งสามชนิด คือ HepG2, Huh7 และ imHC (รูปตัวแทนจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

2.5 ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV 1-4) โดยใช้สายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory strains)

จากผลการทดลองที่แสดงมาข้างต้นพบว่าเซลล์ imHC มีประสิทธิภาพในการสร้างไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (DENV-2, laboratory strain 16681) ได้ดีไม่น้อยไปกว่าเซลล์ตับชนิด HepG2 และ Huh-7 ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน และยังมีการตอบสนองในแง่ของการสร้าง cytokines ได้ใกล้เคียงกับเซลล์ตับปฐมภูมิ (Primary hepatocytes) ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำเซลล์ชนิดนี้มาใช้เป็นตัวแทนที่ดีของเซลล์ตับสำหรับการศึกษากลไกของการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่และการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

ผู้วิจัยได้ใช้เฉพาะไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์ที่ 2 (DENV-2, 16681) เพื่อทำการทดสอบก่อนหน้านี้อย่างหมด และพบว่า imHC มีประสิทธิภาพในการสร้างไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์ที่ 2 ได้ดี แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ก่อโรคได้นั้นมีทั้งหมดสี่ซีโรไทป์ (DENV-1, 2, 3, 4) เราจึงทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาว่าเซลล์ตับ imHC มีการตอบสนองกับไวรัสเด็งกี่ทุกซีโรไทป์อย่างไร โดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ที่ใช้กันทั่วไปในระดับห้องปฏิบัติการ คือ DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87) และ DENV-4 (H241) และมีวิธีการทดลองดังนี้คือ เซลล์ตับ imHC ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้งสี่ซีโรไทป์ด้วยปริมาณเชื้อไวรัสเด็งกี่ต่อเซลล์ MOI ที่ 0.5 หลังจากทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ทำการตรวจวัดการติดเชื้อของเซลล์โดยตรวจวัดการปล่อยไวรัสออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี focus forming assay และการแสดงออกของโปรตีน non-structural protein 1 (NS1) และโปรตีนโครงสร้าง (Envelope protein, E) ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ด้วยวิธี immunofluorescence and flow cytometry จากผลการทดลองพบว่า ไวรัสเด็งกี่ทั้งสี่ซีโรไทป์ตามสายพันธุ์ที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการนั้นสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ imHC ได้ โดยปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 และ E ที่ตรวจวัดได้นั้น มีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกซีโรไทป์ ดังแสดงในรูปที่ 9A, 9B, และ 9C ตามลำดับ เซลล์ imHC ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อ (MOCK) เป็นเซลล์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการทดลอง (negative control)

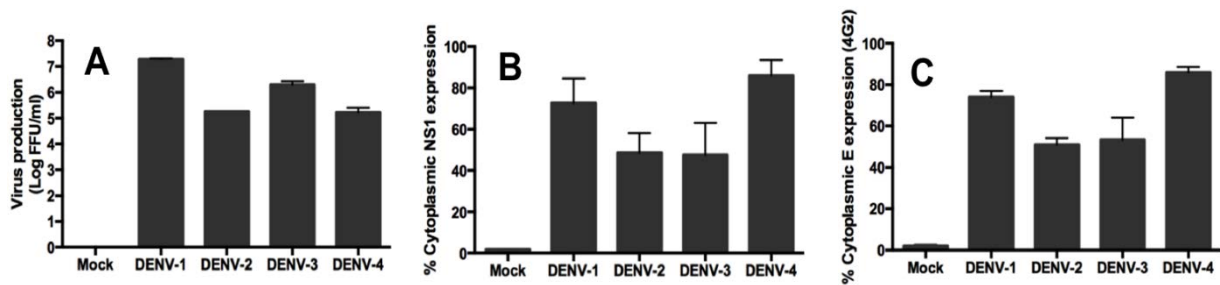


รูปที่ 9 การตอบสนองของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV 1-4) สายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (รูปที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

2.6 ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้งสี่ซีโรไทป์ (four serotypes; DENV 1-4) โดยใช้สายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือดของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (Clinical isolates)

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งเกิดได้ตามธรรมชาติของเชื้อไวรัสทำให้สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้กันทั่วไปในระดับห้องปฏิบัติการนั้นอาจจะมีคุณสมบัติในการก่อโรคที่แตกต่างไปจากไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่อยู่ในตัวอย่างของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าเซลล์ตับ imHC นั้นสามารถตอบสนองและทำการสร้างไวรัสเด็งกี่ได้ แม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เราจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการเพิ่มจำนวนของไวรัสเด็งกี่ของทั้งสี่

ซีโรไทป์ในเซลล์ตับ imHC โดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ซึ่งไวรัสที่แยกได้จากเลือดผู้ป่วยนั้นจะนำมาทำการยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสแต่ละซีโรไทป์โดยใช้เทคนิค nested - PCR และไวรัสที่ทางคณะวิจัยของเรานำมาใช้ในการทดลอง มีดังต่อไปนี้คือ DENV-1 แยกจากตับของคนที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก, DENV-2 แยกจาก plasma ของคนที่ติดเชื้อที่เก็บจาก Clinical cohort ที่โรงพยาบาลขอนแก่น, DENV-3 (DENV-3 Loc1) และ DENV-4 (DENV-4 Loc1) ได้รับการอนุเคราะห์จาก Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS) วิธีการทดลองจะคล้ายกับรายละเอียดที่กล่าวมาข้างต้น โดยเซลล์ตับ imHC ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเต็มที่ทั้งสี่ซีโรไทป์ในแต่ละสายพันธุ์ด้วยปริมาณเชื้อไวรัสเต็มที่ที่ MOI 0.1 และหลังจากทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ก็ทำการตรวจวัดการปล่อยไวรัสออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ และจำนวนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 และ E จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ตับ imHC ตอบสนองต่อไวรัสเต็มที่ทั้งสี่ซีโรไทป์สายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกได้ โดยสามารถสร้างอนุภาคไวรัสและปล่อยออกมาน้ำเลี้ยงเซลล์ รวมทั้งสร้างโปรตีน E และ NS1 ที่จำเพาะต่อไวรัสได้ ดังแสดงในรูปที่ 10A, 10B, และ 10C ตามลำดับ เซลล์ imHC ที่ไม่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อ (MOCK) เป็นเซลล์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการทดลอง (negative control)



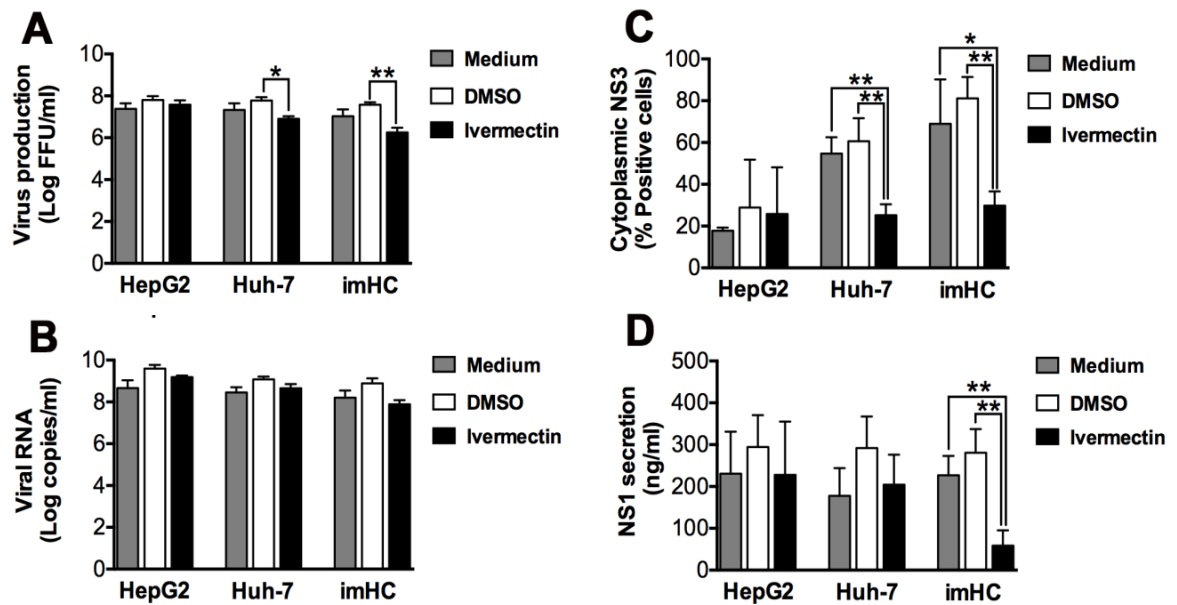
รูปที่ 10 การตอบสนองของเซลล์ตับ imHC ต่อการติดเชื้อไวรัสเต็มที่ทั้งสี่ซีโรไทป์ (DENV 1-4) โดยใช้สายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (รูปที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณมาจากการทดลองซ้ำสามครั้ง)

2.7 เพื่อเป็นแนวทางไปสู่การหายาต้านไวรัสเต็มที่ที่นำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกได้ คณะผู้วิจัยได้เลือกที่จะทดสอบฤทธิ์ของยาไอเวอร์เมกตินโดยใช้เซลล์ตับ imHC และเซลล์ HepG2 และ Huh-7 เป็นเซลล์โมเดล ซึ่งสาเหตุที่เลือกยาไอเวอร์เมกตินมาทดสอบนั้นเพราะว่าชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเต็มที่และไวรัสใกล้เคียงชนิดอื่นๆ และเป็นยาที่ผ่านการรับรองมาตรฐานความปลอดภัยจาก FDA แล้วและมีการใช้อยู่แล้วในคนไข้โรคอื่นๆ (เช่น เหาช้าง และ river blindness เป็นต้น)

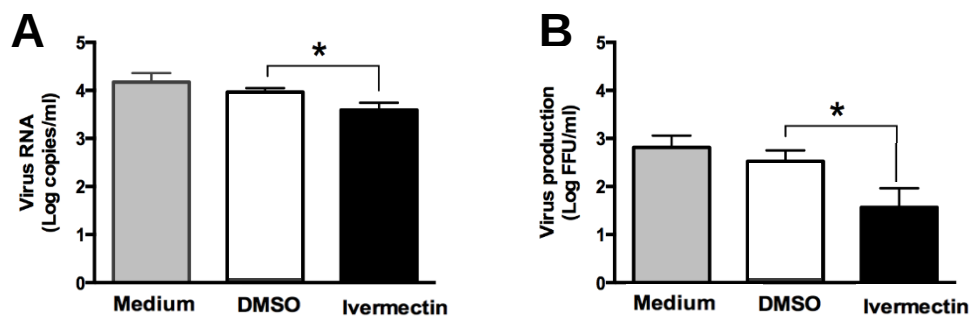
จากผลการทดลองเบื้องต้นในเซลล์ตับทั้งสามชนิด (imHC, Huh-7, HepG2) พบว่า ค่าความเข้มข้นของยาไอเวอร์เมกตินที่ $5 \mu\text{M}$ เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับทั้งสามชนิด และมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไวรัสได้ประมาณ 50% เราจึงใช้ยาที่ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาไอเวอร์เมกตินของเซลล์ตับทั้งสามชนิด โดยทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งสามชนิดใน 24-well plate เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นทำการบ่มเซลล์กับเชื้อไวรัสเต็มที่ที่ multiplicity of infection (MOI) of 0.1 เป็นเวลาสองชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อขจัดไวรัสส่วนเกินที่อยู่ภายนอกเซลล์ออก จากนั้นจึงทำการเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มียาไอเวอร์เมกตินที่ความเข้มข้น $5 \mu\text{M}$ ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากยาไอเวอร์เมกตินนั้นจะละลายได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี 0.5% (v/v) DMSO อยู่ เราจึงใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ในปริมาณที่

เท่ากันนี้เป็นหนึ่งในกลุ่มควบคุมในการให้ยา และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียาหรือ DMSO อยู่เลยเป็นอีกหนึ่งกลุ่มควบคุม และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เราจึงเก็บเซลล์ดับทั้งสามชนิดทั้งที่ให้ยาและไม่ให้ยาและน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละกลุ่มมาทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบปริมาณของไวรัสด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ (A) ตรวจสอบปริมาณของไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus forming assay, (B) ตรวจสอบปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี RT-PCR, (C) ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน non-structural protein 3 (NS3) ในเซลล์ด้วยวิธี immunofluorescent staining with anti-NS3 antibody and flow cytometry, (D) ตรวจสอบปริมาณการปล่อยโปรตีน non-structural protein 1 (NS1) ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดลองซ้ำสามครั้งมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังแผนภูมิที่แสดงตามรูปด้านล่าง ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าเซลล์ดับชนิด imHC และ Huh-7 นั้นมีการตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไวรัสของยาไอเวอร์เมกตินได้ดีกว่าเซลล์ชนิด HepG2 ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณของไวรัสตั้งที่วัดได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (panel A ของรูปที่ 11) และปริมาณของโปรตีน NS3 ที่แสดงออกในเซลล์ที่ติดเชื้อ (panel C ของรูปที่ 11) นั้นมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่มียาไอเวอร์เมกตินที่ความเข้มข้น 5 μM อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (Ivermectin, black bars) กับสถานะควบคุมที่ไม่มียาแต่มี DMSO (DMSO, white bars) หรือสถานะที่มีแต่น้ำเลี้ยงเซลล์ (Medium, gray bars) และเมื่อศึกษาจากผลการทดลองในแง่ของการยับยั้งการสร้างและปล่อยโปรตีน NS1 เพื่อออกสู่ภายนอกเซลล์พบว่า ยาไอเวอร์เมกตินออกฤทธิ์ในการยับยั้งการปล่อยโปรตีน NS1 ในเซลล์ดับชนิด imHC ได้ดีกว่าในเซลล์ดับอีกสองชนิด เพราะเป็นเซลล์ชนิดเดียวที่แสดงให้เห็นการลดลงของปริมาณ NS1 ในสถานะที่มียาได้อย่างมีนัยสำคัญ (panel D ของรูปที่ 11)

นอกจากนั้นเพื่อยืนยันว่ายาไอเวอร์เมกตินมีผลในการยับยั้งการสร้างไวรัสตั้งที่ในเซลล์ดับชนิดปฐมภูมิ (Primary human hepatocytes) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเซลล์ดับในสภาวะปกติของมนุษย์มากที่สุด เราได้นำเซลล์ดับชนิดปฐมภูมิมาล้างใน 24-well plate และทำให้ติดเชื้อไวรัสตั้งที่และทดสอบกับยาไอเวอร์เมกตินที่ความเข้มข้น 5 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธีการเดียวกันกับเซลล์ดับแบบ cell lines ทั้งสามชนิดที่แสดงผลข้างต้น และตรวจสอบปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี RT-PCR (panel A ของรูปที่ 12) และวัดปริมาณของไวรัสที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี focus forming assay (panel B ของรูปที่ 12) ผลการทดลองจากการทำซ้ำสามครั้งพบว่า เซลล์ดับที่ติดเชื้อที่เลี้ยงในสถานะที่มียาไอเวอร์เมกตินอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์นั้น (Ivermectin, black bars) มีการสร้างไวรัสในปริมาณที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในสถานะควบคุมที่ไม่มียาแต่มี DMSO (DMSO, white bars) หรือสถานะที่มีแต่น้ำเลี้ยงเซลล์ (Medium, gray bars)



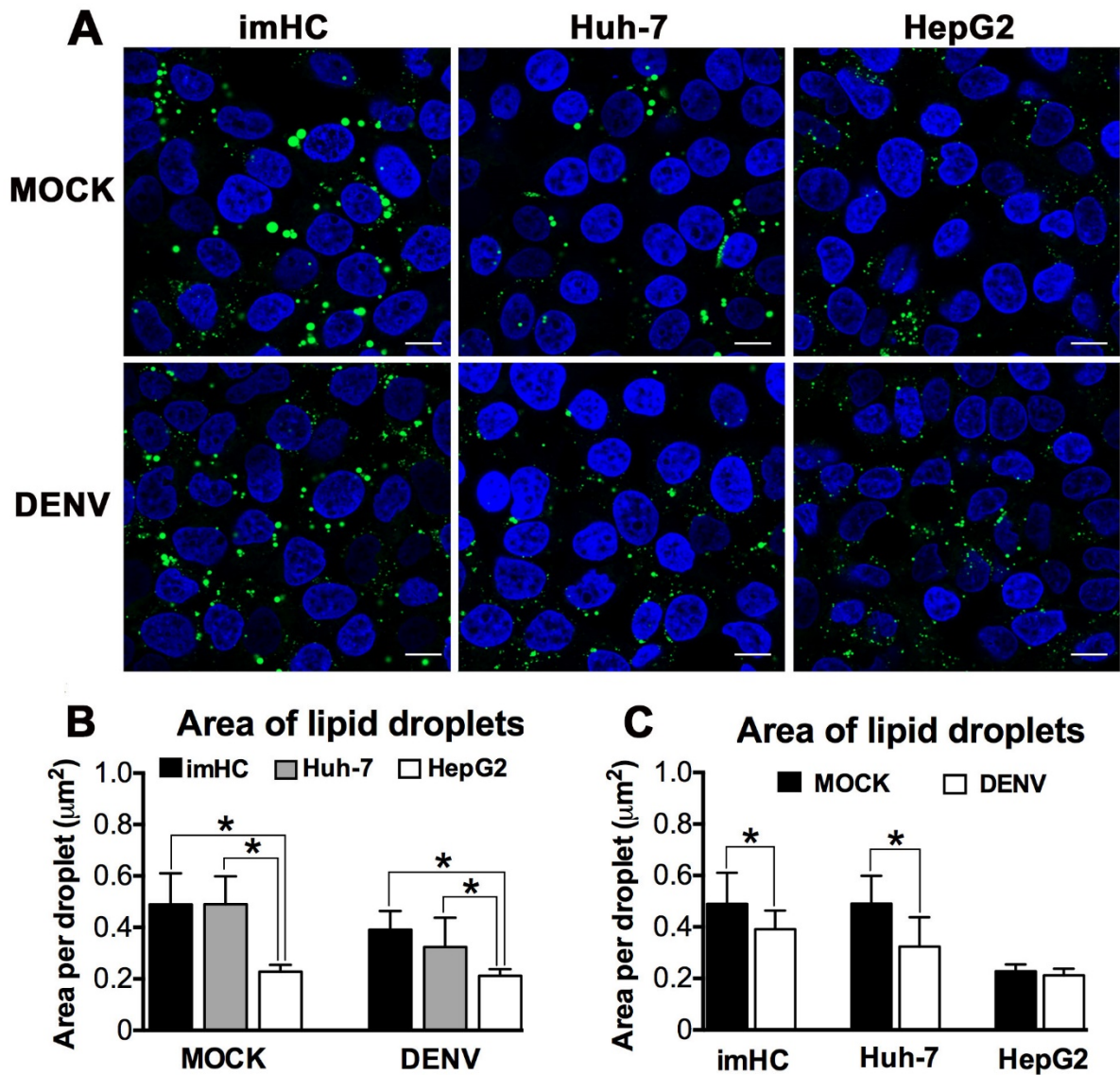
รูปที่ 11 ประสิทธิภาพของยาไอเวอร์เมกตินในการยับยั้งการสร้างไวรัสเด็งกีในเซลล์ตับสามชนิดคือ imHC, HepG2, และ Huh-7 cell lines และค่าที่แสดงในแผนภูมินี้คือ mean $\pm$ S.D. จากการทดลองสามครั้ง



รูปที่ 12 ประสิทธิภาพของยาไอเวอร์เมกตินในการยับยั้งการสร้างไวรัสเด็งกีในเซลล์ตับชนิดปฐมภูมิ ค่าที่แสดงในแผนภูมินี้คือ mean $\pm$ S.D. จากการทดลองสามครั้ง

3. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลของเซลล์ตับ (imHC และเซลล์ตับชนิดอื่นๆ) และทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ lipid droplets และปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับ เมื่อมีการตอบสนองต่อไวรัสเด็งกีโดยวิธี Mass Spectrometry

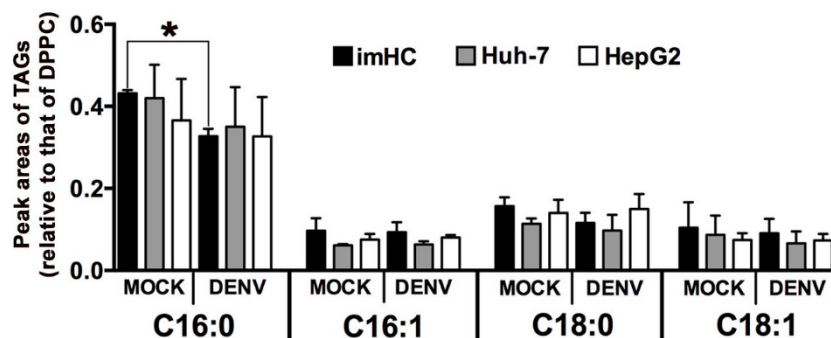
3.1 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ lipid droplets ในเซลล์ตับทั้งสามชนิดนั้น สืบเนื่องมีการศึกษาในอดีตที่บ่งชี้ถึงบทบาทของ Lipid metabolism กับการติดเชื้อไวรัสเด็งกี ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ lipid droplets และปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับ เมื่อมีการตอบสนองต่อไวรัสเด็งกี โดยเริ่มต้นด้วยการใช้วิธีการย้อมเซลล์ด้วย BODIPY 409/503 ซึ่งเป็น cell-permeable fluorescent dye ที่มีความจำเพาะต่อ lipid droplets และบันทึกภาพของ lipid droplets ที่ย้อมได้ในเซลล์ตับทั้งก่อนและหลังติดเชื้อไวรัสเด็งกี (MOI of 0.1, 48 ชั่วโมง) ด้วยวิธี confocal microscopy และนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของ lipid droplets โดยใช้ image J software เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ตับทั้งสามชนิดพบว่า เซลล์ตับทั้งสามชนิดมีขนาดของ lipid droplets ที่แตกต่างกัน คือ เซลล์ตับชนิด imHC และ Huh-7 จะมีขนาดของ lipid droplets ที่ใหญ่กว่า เมื่อเทียบกับ HepG2 (รูปที่ 13A และ 13B) นอกจากนี้หลังจากเซลล์ได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกีแล้วพบว่า ขนาดของ lipid droplets ในเซลล์ตับชนิด imHC และ Huh-7 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับขนาดของ lipid droplets ในเซลล์ชนิดเดียว ก่อนก่อนที่จะติดเชื้อไวรัสเด็งกี แต่การเปลี่ยนแปลงในเรื่องขนาดของ lipid droplets ต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส ในเซลล์ HepG2 จะไม่ชัดเจนเท่ากับเซลล์อีกสองชนิด (รูปที่ 13C)



รูปที่ 13 ผลของการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ lipid droplets ในเซลล์ตับทั้งสามชนิดเมื่อได้รับการติดเชื้อ ไวรัสเด็งกี (A)

ภาพจาก confocal microscopy หลังจากทำการย้อม lipid droplets ด้วย BODIPY 409/503 ในเซลล์ตับทั้งก่อนและหลังติดเชื้อไวรัสเด็งกี (MOI of 0.1, 48 ชั่วโมง) ภาพที่ได้จาก confocal microscopy ได้นำมาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดของ lipid droplets โดยใช้ image J software โดยเปรียบเทียบ ระหว่างเซลล์ต่างชนิดกัน (B) หรือเปรียบเทียบในเซลล์ชนิดเดียวกันในช่วงก่อนและหลังการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (C) ผลที่แสดงในรูป B&C คือค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาด lipid droplets ที่คำนวณได้จากเซลล์ทั้งสาม ชนิดจำนวนทั้งหมด 300-400 เซลล์ เครื่องหมาย * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Student's *t*-test analysis

3.2 เพื่อศึกษาปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับ ทั้งสามชนิดเราได้ทำการสกัดไขมันจากเซลล์ตับทั้งสามชนิด (HepG2, Huh-7 and imHC cells) ที่ผ่านการทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี (MOI of 0.1) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการสกัดแบบ Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) จากนั้นนำไขมันที่สกัดได้จากเซลล์ทั้งสามชนิดมาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols โดยวิธี liquid chromatography/mass spectrometry-based lipidomic analysis โดยใช้โหมด neutral loss scanning ที่จำเพาะต่อการแตกตัวของโครงสร้างกรดไขมันชนิดหลักทั้งสี่ชนิดของ triacylglycerols คือ palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1), and stearic (C18:0) acids โดยเปรียบเทียบกับปริมาณของไขมันชนิดฟอสโฟลิปิด ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ คือ dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, C16:0) ที่วัดได้ด้วยวิธี precursor ion scanning of 184 (phosphocholine group) โดย DPPC นั้นทำหน้าที่เสมือน internal standard ที่ใช้เพื่อ normalize ค่าของ triacylglycerols ในเซลล์ชนิดเดียวกัน ก่อนที่จะนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์ แต่ละชนิด และผลจากการวิเคราะห์ (รูปที่ 13) แสดงให้เห็นว่า เมื่อได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกีปริมาณของ triacylglycerols ในเซลล์ชนิด imHC มีการลดลง อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ triacylglycerols ที่มี palmitic (C16:0) เป็นองค์ประกอบจะลดลงถึง 75% ของปริมาณ ไขมันในเซลล์ที่ไม่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (mock-infected cells) ส่วนในเซลล์ Huh-7 นั้นจะเห็นว่ามีความโน้ม ในการลดปริมาณของ triacylglycerols หลังจากเซลล์ได้รับติดเชื้อแต่การเปลี่ยนแปลงนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และในเซลล์ชนิด HepG2 นั้นจะต่างกับเซลล์อีกสองชนิด คือจะเห็นการ เปลี่ยนแปลงของ triacylglycerols หลังการติดเชื้อน้อยมากหรือแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ผลของการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับทั้งสามชนิดเมื่อได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกี

ไขมันที่สกัดได้จากเซลล์ตับสามชนิด ทั้งก่อนและหลังติดเชื้อไวรัสเด็งกี (MOI of 0.1, 48 ชั่วโมง) ถูกใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols โดยวิธี liquid chromatography/mass spectrometry-based lipidomic analysis โดยใช้โหมด neutral loss scanning ที่จำเพาะต่อการแตกตัวของโครงสร้างกรดไขมันชนิดหลักทั้งสี่ชนิดของ triacylglycerols คือ palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1), and stearic (C18:0) acids ผลที่แสดงคือค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานของปริมาณ triacylglycerols ในแต่ละเซลล์หลังจากนำค่าที่ได้มา normalized ด้วยปริมาณไขมันชนิด DPPC ในเซลล์ชนิดนั้นๆ และเป็นผลจากการทดลองซ้ำสามครั้ง และเครื่องหมาย * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Student's *t*-test analysis

สรุปผลการทดลอง

1. อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ imHC ที่ได้จากการกระตุ้นสเต็มเซลล์นั้นใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ตับ Huh-7 ที่เป็น cell lines ที่ใช้กันอยู่ในห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็ง
2. เซลล์ imHC มีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสเด็งกีและมีการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไวรัสเด็งกี (DENV receptors) ได้ใกล้เคียงกับเซลล์ Huh-7 และได้ดีกว่าเซลล์ HepG2
3. ไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ imHC ได้ และอัตราการเพิ่มปริมาณของ DENV-2 ในเซลล์ตับ imHC นั้น ไม่แตกต่างจาก เซลล์ hepatocyte cell lines อีกสองชนิด คือ Huh-7 และ HepG2 ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบโดยการวัดการแสดงออกของโปรตีน E ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีและการแสดงออกของโปรตีน NS1 บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ รวมถึงการปล่อยไวรัสออกมาในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ imHC นั้นสามารถนำมาใช้เป็น target cell model ของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้
4. อัตราการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีของเซลล์ทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าในเซลล์ HepG2 จะมีการตายที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในเซลล์ Huh-7 และ imHC เมื่อมีการติดเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะมีการตายแบบ Apoptosis ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในเซลล์ Huh7 และ imHC เมื่อมีการติดเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. เซลล์ตับทั้งสามชนิดมีการตอบสนองและมีระดับการแสดงออกของ cytokine แต่ละชนิดแตกต่างกัน ออกเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่สอง (DENV-2) โดยพบว่าเซลล์ตับทั้งสามชนิดจะมีการแสดงออกของระดับ RNA ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและเพิ่มขึ้นตามปริมาณไวรัสที่ติดเชื้อประกอบด้วย cytokine ดังนี้ IL-8, IL-6, RANTES, MIP-1 β , IFN- β และ IFN- α และเซลล์ imHC เมื่อติดเชื้อไวรัสเด็งกีแล้วจะพบมีการแสดงออกระดับ RNA ของ MCP-1 ที่เพิ่มสูงขึ้นโดยจะไม่พบใน hepatocyte cell lines อีกสองชนิด คือ Huh7 และ HepG2 เลย ซึ่งการแสดงออกของ MCP-1 ใน imHC นั้น ตรงกับผลของรายงานก่อนหน้านี้ในเซลล์ Primary hepatocyte
7. เซลล์ imHC มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ดีทั้งสี่วิธีโรไทป์และทั้งสายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory strains) และสายพันธุ์ที่แยกมาจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือดของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (Clinical isolates)
8. เซลล์ตับทั้งสามชนิดมีขนาดของ lipid droplets ที่แตกต่างกัน คือ เซลล์ตับชนิด imHC และ Huh-7 จะมีขนาดของ lipid droplets ที่ใหญ่กว่า เมื่อเทียบกับ HepG2 และหลังจากเซลล์ได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกีแล้วพบว่า ขนาดของ lipid droplets ในเซลล์ตับชนิด imHC และ Huh-7 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับขนาดของ lipid droplets ในเซลล์ชนิดเดียวกันก่อนที่จะติดเชื้อไวรัสเด็งกี
9. ปริมาณของไขมันชนิด triacylglycerols ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ lipid droplets ภายในเซลล์ตับเมื่อได้รับการติดเชื้อไวรัสเด็งกีปริมาณของ triacylglycerols ในเซลล์ตับชนิด imHC มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ triacylglycerols ที่มี palmitic (C16:0) ส่วนในเซลล์ Huh-7 นั้นจะเห็นว่ามีความโน้ม ในการลดปริมาณของ triacylglycerols หลังจากที่เซลล์ได้รับการติดเชื้อแต่การเปลี่ยนแปลงนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และในเซลล์ชนิด HepG2 นั้นจะต่างกับเซลล์อีกสองชนิด คือ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของ triacylglycerols หลังการติดเชื่อน้อยมากหรือแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย
10. จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ เราสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ตับชนิด imHC ที่มีต้นกำเนิดมาจากสเต็มเซลล์จะมีการ เปลี่ยนแปลงของไขมันในเซลล์เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (DENV2, MOI 0.1, 48 hours) ได้ชัดเจนกว่าเซลล์ตับที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็งอย่าง Huh-7 และ HepG2 ทั้งนี้

อาจจะเป็นเพราะความแตกต่างในแง่ของการแสดงออกของยีนหรือ เฝ้าผลาญไขมันในเซลล์เหล่านี้ เนื่องจากความไวในแง่ของ lipid metabolism ในแง่ของการตอบสนองของเซลล์ต่อนิวเคลียส imHC ต่อไวรัสเด็งกี ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เซลล์ชนิดนี้เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นเซลล์เป้าหมายให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกของไวรัส ที่ใช้ประโยชน์จากไขมันในเซลล์เป้าหมายเป็นแหล่งพลังงานในการสร้างอนุภาคไวรัส และความเข้าใจนี้จะนำไปสู่การค้นหายาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้ในอนาคต

ประโยชน์ที่ได้รับ

เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยได้ขยายงานเพิ่มเติมในส่วนของการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลของเซลล์ตับ (imHC) เมื่อมีการตอบสนองต่อไวรัสเด็งกีโดยวิธี Mass Spectrometry ซึ่งมีความร่วมมือกับ Dr. Kym Francis Faull, Director of Pasarow Mass Spectrometry Laboratory, David Geffen School, University of California at Los Angeles (UCLA) ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้มาเป็นที่ปรึกษาของโครงการและช่วยในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไขมันในเชิงปริมาณและคุณภาพโดย Mass spectrometry

เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ผลงานที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่และค้นพบว่าเซลล์ตับชนิด imHC ที่พัฒนามาจากการกระตุ้นสเต็มเซลล์ของมนุษย์ มีคุณลักษณะที่เหมาะสมและใกล้เคียงกับเซลล์ตับชนิดปฐมภูมิ (Primary hepatocyte) มากกว่าเซลล์ตับที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็ง (Huh-7 และ HepG2) ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นเซลล์เป้าหมายทางเลือกใหม่ให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกของไวรัสในการก่อโรคในเซลล์เป้าหมาย และความเข้าใจนี้จะนำไปสู่การค้นหายาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้ในอนาคต

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. **Kongmanas K**, Punyadee N, Wasuworawong K, Songjaeng A, Pewkliang Y, Manochewa S, Thiemmecca S, Sa-ngiamsuntorn K, Faull KF, Hongeng S, and **Avirutnan P**. Immortalized Stem Cell-Derived Hepatocyte-like Cells: An Alternative Model for Studying Dengue Pathogenesis and Therapy. Manuscript in preparation for submission to an international journal in Q1.
2. ดร.เกศศิริ คงมนัส นักวิจัยหน่วยวิจัยโรคไขเลือดออกซึ่งเป็นผู้รับผิดชอบในโครงการวิจัยนี้ร่วมกับดร. นันทยา พรหมัน ได้รับเชิญให้เป็นผู้บรรยายในงานประชุมวิชาการประจำปีของสมาคมไวรัสวิทยา เมื่อวันที่ 23-24 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ที่ผ่านมา จึงนำงานวิจัยในโครงการนี้บางส่วนไปบรรยาย ภายใต้ชื่อการบรรยายเรื่อง “Stem Cell-Derived Hepatocytes: An Alternative Host Model For Studying Dengue Pathogenesis and Therapy” โดยได้รับเชิญถึงที่มาของแหล่งทุนของโครงการในการบรรยายนี้ด้วย และขอขอบคุณทางแหล่งทุนมา ณ ที่นี้ด้วย

Malarial Research

หลักการและเหตุผล

โรคมาลาเรีย เป็นหนึ่งในโรคเขตร้อนที่สำคัญ เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวชนิด *Plasmodium spp.* ซึ่งในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ยังพบว่ามีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้อยู่มาก ในปัจจุบัน มีข้อมูลหลักฐาน ทั้งในการทดลองด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง การทดลองในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย ที่สนับสนุนว่า EVs ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ของโฮสต์ ทั้งชนิดที่มีขนาดใหญ่ ที่เรียกว่าไมโครพาร์ติเคิล (microparticles:MPs) หรือ ชนิดที่มีขนาดเล็ก ที่เรียกว่าเอกโซโซม (exosomes) นั้น โดยเฉพาะ EVs ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เกร็ดเลือด เซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์ชนิดเอ็นโดทีเลียล (endothelial cells) มีความสำคัญต่อการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง เช่น การเกิด cerebral malaria ได้นอกจากนี้ EVs เหล่านี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารระหว่างเชื้อโปรโตซัว ซึ่งในการทดลองด้วยการเพาะเชื้อในห้องทดลองนั้น พบว่ามีการส่งผ่านยีนดื้อยาโดย EVs ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในกลุ่มประชากรของเชื้อได้อีกด้วย(3-4) รวมทั้ง EVs นี้ ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารระหว่างเชื้อโปรโตซัวหรือเซลล์ที่มีการติดเชือกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย เนื่องจากเซลล์โมโนไซต์ (monocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญของการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อ *Plasmodium spp.* ในระหว่างที่เชื้อโปรโตซัวมีการเจริญเติบโตใน erythrocytic cycle ดังนั้น หลายงานวิจัยจึงให้ความสำคัญของการศึกษาผลของ EVs นี้ ต่อการทำงานของเซลล์ monocytes โดยมีผลงานวิจัยรายงานว่า MPs สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ monocytes โดยเพิ่มการสร้างไซโตไคน์ (cytokines) ในกลุ่มของ pro-inflammatory cytokines จากเซลล์ monocytes ซึ่ง cytokines ในกลุ่มนี้ มีความสำคัญทั้งในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆได้(5-7) อย่างไรก็ตาม EVs นี้ก็ยังสามารถกระตุ้นการสร้าง cytokines ที่มีผลยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน ซึ่งความสมดุลระหว่างการทำงานในสองแบบนี้ ยังไม่เป็นที่แน่ชัด

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ extracellular vesicles ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ของโฮสต์ ต่อการทำงานของเซลล์ monocytes ในการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*)

วิธีการดำเนินการ

1. การขออนุมัติการทำวิจัยในคน

โครงการวิจัยนี้ผ่านการอนุมัติการทำวิจัยในคนจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (COA no. Si 199/2017)

2. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*

เชื้อ *P. falciparum* ที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ด้วยกัน คือ สายพันธุ์ 3D7 และ NF54 ซึ่งเป็น lab strain และสายพันธุ์ NAC130 และ AA1505 ซึ่งเป็น isolated strain ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคต่างกัน (โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.เกศินี โชติวานิช ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบวิเคราะห์ของคุณลักษณะของ EVs ที่สร้างขึ้นจากการเชื้อ *P. falciparum* ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน

ผู้วิจัยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์เหล่านี้ในขวดทดลอง โดยให้มีการเจริญเติบโตต่อเนืองอย่างสม่ำเสมอ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 medium (Gibco) ร่วมกับ 0.5% Albumax II (Gibco), 2 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 100 μ M Hypoxanthine, 25 mM Hepes buffer และ Gentamicin ภายใต้สภาวะ 5% hematocrit, 37°C, 5% CO₂ ทั้งนี้ ในการทำ

การ synchronize เชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อ *P. falciparum* ที่มีระยะ ring-stage เหมือนกันทั้งหมดเพื่อใช้ในการทำการทดลองขั้นตอนต่อไป ให้ใช้น้ำยา 5% D-Sorbitol (Sigma) หลังจากทำการ synchronize และปรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อให้อยู่ที่ 5% parasitemia ใน 3% Hematocrit แล้ว จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำไปปั่นแยก EVs ต่อไป(late-stage EVs)

3. การปั่นแยก EVs จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* (culture supernatant)

การปั่นแยก EVs จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* นั้น ใช้วิธี multi-steps centrifugation ตามขั้นตอนดังนี้ คือ ทำการปั่นตก culture supernatant ที่ความเร็ว 1,500×g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนของเซลล์ที่ปนอยู่ออกก่อน จากนั้น นำส่วน supernatant ด้านบน มาปั่นตกต่อที่ความเร็ว 13,000×g เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำส่วนของ supernatant ด้านบน กรองผ่านตัวกรองที่มีขนาด 1.2 µm จากนั้น นำ supernatant ที่ผ่านการกรองแล้ว มาปั่นแยกด้วยเครื่อง refrigerated super speed centrifuge ที่ความเร็ว 20,000×g เป็นเวลา 70 นาที จากนั้น ทำการปั่นล้างส่วนที่เป็น pellet ซึ่งคาดว่าจะเป็ MPs โดยใช้ phosphate buffered saline buffer (PBS), pH 7.4 และปั่นที่ความเร็ว 20,000×g เป็นเวลา 70 นาที อีกครั้ง แล้วจึงเก็บ MPs นี้ ใน PBS ปริมาณ 50 µL ที่ -80°C สำหรับส่วนของ supernatant ด้านบน หลังจากการปั่นตก MPs แล้วนั้น ให้ทำการกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาด 0.2 µm แล้วจึงนำ supernatant ที่ผ่านการกรองมาปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 110,000×g เป็นเวลา 90 นาที ทำการปั่นล้างส่วนของ pellet ที่ได้ ซึ่งคาดว่าจะเป็ exosomes นี้ ที่ความเร็ว 110,000×g เป็นเวลา 90 นาทีอีกครั้ง แล้วเก็บรักษาใน PBS ปริมาณ 50 µL ที่ -80°C เพื่อทดสอบคุณลักษณะและใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ในส่วนของ EVs ควบคุมที่สร้างจาก non-infected red blood cells นั้น ได้ใช้ EVs ที่ปั่นแยกจากสารนำจากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติให้มีการสร้าง EVs โดยใช้ตัวกระตุ้น A23187 (A23187 EV)

4. การวิเคราะห์คุณลักษณะของ EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum*

การวิเคราะห์คุณลักษณะของ EVs จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* กระทำด้วยหลายวิธีการ คือ การวิเคราะห์โปรตีน EV markers โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis, การวิเคราะห์ขนาดและจำนวนโดยวิธี nanoparticle tracking analysis (NTA) โดยใช้เครื่อง NanoSight NS300 และการวิเคราะห์รูปร่างลักษณะของ EVs โดยใช้วิธี Transmission electron microscopy (TEM)

5. การทดสอบผลของ EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ต่อคุณลักษณะของเซลล์ human primary monocytes

ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์ human primary monocytes ที่ได้จากการปั่นแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) จาก heparinized blood ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque centrifugation จากนั้นทำการแยก human monocytes ออกจาก PBMCs โดยใช้วิธี Negative bead magnetic separation โดยใช้ชุด MojoSort™ Human Pan Monocyte Isolation Kit (Biolegend) จากนั้น ทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเซลล์ monocytes ที่แยกได้ โดยการตรวจวัดการแสดงออกของ CD14 และ CD16 บนผิวเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry โดยพบว่าด้วยกระบวนการแยกเซลล์นี้ ทำให้ได้ความบริสุทธิ์ของ human primary monocytes สูง และสามารถแบ่งเซลล์โมโนไซต์ออกเป็น กลุ่ม classical monocytes (CD14+ CD16-), intermediated monocytes (CD14+ CD16+) และ non-classical monocytes (CD14dim CD16+) ได้ มีความเหมาะสมกับการทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

จากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (coculture) ระหว่างเซลล์ human primary monocytes ที่แยกได้นี้ กับ EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* และ EVs ที่แยกได้จากสารนำจาก

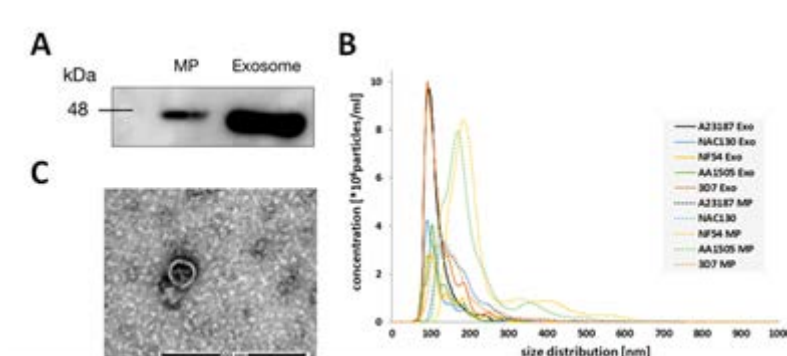
การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติให้มีการสร้าง EVs โดยใช้ตัวกระตุ้น A23187 (A23187 EV) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยในการกระตุ้นเซลล์ human primary monocytes นี้ ได้มีการใช้ 50 ng/ml LPS ร่วมกับ 10 ng/ml IFN- γ เป็นตัวกระตุ้นควบคุมของการเจริญไปเป็น M1-like monocytes และ 100 ng/ml IL-4 ร่วมกับ 100 ng/ml IL-13 เป็นตัวกระตุ้นควบคุมของการเจริญไปเป็น M2-like monocytes

เมื่อครบเวลา ทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ย้อมเซลล์ ด้วย Zombie Aqua™ Fixable Viability dye (Biolegend) ต่อจากนั้น บ่มเซลล์ด้วย Human TruStain FcX™ และทำการย้อมเซลล์ด้วย fluorochrome-labeled specific antibodies ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ allophycocyanin (APC) conjugated-CD14, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated-CD16, PE conjugated-CD80 (Biolegend; clone 2D10), PE/Dazzle594 conjugated-CD86 (Biolegend; clone IT2.2), BV421 conjugated-CD163 (Biolegend; clone GHI/63) และ Alexa Fluor®700 (Alexa700) conjugated-CD206 (Biolegend; clone 15-2) และวัดการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD14, CD16, CD80, CD86, CD163 และ CD206 ด้วยวิธีทางฟลูออไรโดเมตรี (LSRII, BD Bioscience)

ผลการดำเนินงาน

1. ผลการทดสอบคุณลักษณะของ EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum*

จากกระบวนการปั่นแยก EVs ด้วยวิธี multi-step centrifugation นี้ ทำให้ได้ MPs และ exosome ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์คุณลักษณะการแสดงออกของโปรตีน flotillin-1 ซึ่งใช้เป็น EVs marker โดยวิธี SDS-PAGE และ western blot analysis พบว่า ทั้ง MPs และ exosome ที่ได้จากกระบวนการปั่นแยกนี้ มีการแสดงออกของโปรตีน flotillin-1 นี้ (รูปที่ 1A) และเมื่อนำ EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* แต่ละ strain ทั้งส่วนที่เป็น MPs (NAC130 MP, NF54 MP, AA1505 MP และ 3D7 MP) และ Exosome (NAC130 Exo, NF54 Exo, AA1505 Exo และ 3D7 Exo) และ A23187 EVs (A23187 MP และ A23187 Exo) ไปวิเคราะห์ขนาดและจำนวนโดยวิธี NTA พบว่า ขนาดของ EVs ที่แยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* มีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 175-241 nm สำหรับ MP และ 121-143 nm สำหรับ exosome และ ขนาดของ EVs ที่จากสารน้ำได้จากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วยสาร A23187 มีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 164.9 ± 2 nm สำหรับ MPs และ 80.4 ± 1 nm สำหรับ exosome (รูปที่ 1B) ซึ่งเมื่อ EVs วิเคราะห์รูปร่างลักษณะของ EVs ด้วยวิธี TEM นั้น พบว่ามีลักษณะของ membrane-enclosed vesicle ที่มีขนาดเข้ากันได้กับผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี NTA (รูปที่ 1C)

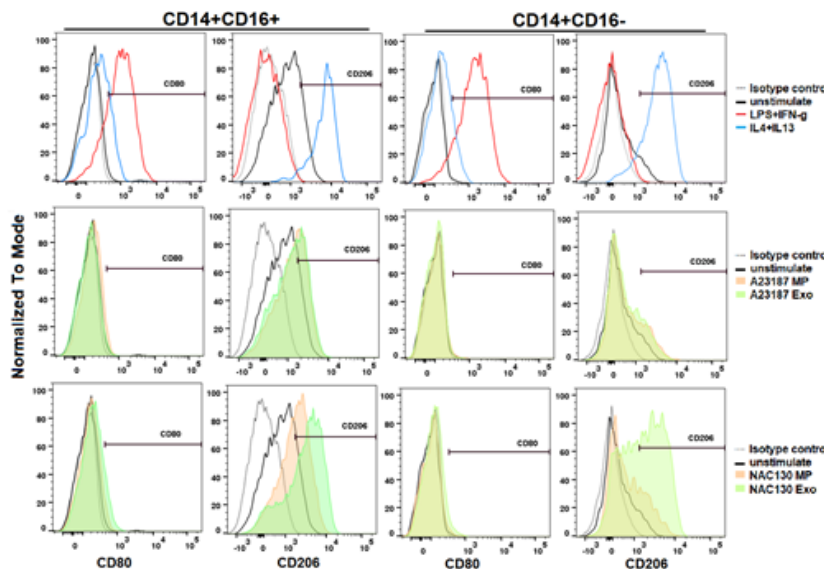


รูปที่ 1 (A) แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน Flottinlin-1 ที่อยู่ใน MPs และ exosome โดยวิธี SDS-PAGE และ western blot analysis (B) แสดงผลของขนาดและจำนวนของ MPs และ exosome ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ทั้ง 4 strains โดยวิธี NTA (C) แสดงรูปร่างลักษณะ exosome ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* โดยวิธี TEM

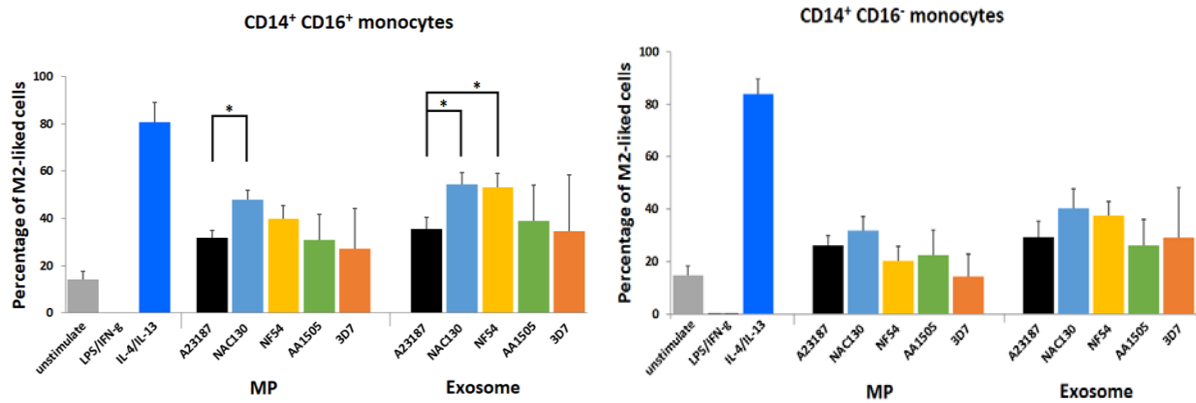
2. การศึกษาผลของ EVs ต่อคุณลักษณะและการทำงานของเซลล์ human primary monocytes

การศึกษาการกระตุ้นเซลล์ human primary monocytes ด้วย LPS/IFN- γ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นควบคุมของการเจริญไปเป็น M1-like monocytes พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ CD80 บนผิวเซลล์ในระดับสูง และมีการแสดงออกของ CD206 บนผิวเซลล์ในระดับต่ำ ในขณะที่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IL-4 ร่วมกับ IL-13 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นควบคุมของการเจริญไปเป็น M2-like monocytes นั้น มีการแสดงออกของ CD206 บนผิวเซลล์ในระดับสูง (รูปที่ 2 บน) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับ A23187 EV (A23187 MP และ A23187 Exo) ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของ CD80 และ CD206 บนผิวเซลล์ human primary monocytes (รูปที่ 2 แถวกลาง) แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับ EVs ที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อของ *P. falciparum* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (NAC130 MP และ NAC130 Exo) พบว่า เซลล์ human primary monocytes ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย NAC130 Exo มีแนวโน้มของการถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง CD206 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ human primary monocytes ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (รูปที่ 2 แถวล่าง)

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ M1-like และ M2-like monocytes พบว่า EVs ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ NAC130 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงในคนไข้ สามารถกระตุ้นให้มีร้อยละของ M2-like monocytes ในเซลล์ primary monocytes กลุ่ม CD14+CD16+ สูงกว่าสายพันธุ์อื่น (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 รูปตัวอย่างการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD80 และ CD206 บนผิวเซลล์ human primary monocytes ในกลุ่มของ CD14+ CD16+ monocytes และ CD14+ CD16- monocytes เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ IL-4/IL-13, A23187 EVs หรือ parasitized EVs เป็นเวลา 60 ชั่วโมง



รูปที่ 3 แสดง mean $\pm$ SEM ของค่าร้อยละของเซลล์ primary monocytes ที่มีการแสดงออกของ M2-like monocytes เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ , IL-4/IL-13, A23187 EVs หรือ parasitized EVs เป็นเวลา 60 ชั่วโมง (n=3)

Output ที่ได้จากโครงการ

อยู่ในระหว่างวิเคราะห์ข้อมูลและเตรียม manuscript

Stem Cell Research

หลักการและเหตุผล

เซลล์ต้นกำเนิดอินดิฟิฟลูเอนซ์ (induced pluripotent stem cells, iPSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดและเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ร่างกายได้ทุกชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถสร้างได้จากเซลล์ร่างกายหลายชนิด เช่น เซลล์ผิวหนัง เซลล์เม็ดเลือด เซลล์จากเลือดสายสะดือ เซลล์รากผม เซลล์ตับ เซลล์จากกระเพาะอาหาร และเซลล์ประสาท โดยเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างขึ้นจะมีสารพันธุกรรมเหมือนกับเซลล์ร่างกายของผู้บริจาคหรือผู้ป่วย เซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จึงเป็นเครื่องมือวิจัยที่มีประสิทธิภาพอย่างยิ่งในงานวิจัยเพื่อศึกษาชีววิทยาการเจริญและพยาธิกำเนิดของโรค ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาและเป็นความหวังใหม่ที่จะนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยในเชิงเวชศาสตร์ฟื้นฟูเพื่อรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อม เนื่องจากการใช้เซลล์หรืออวัยวะที่พัฒนาขึ้นจากเซลล์ของผู้ป่วยเองนั้นจะสามารถลดปัญหาการเข้ากันไม่ได้ของภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยกับผู้ป่วย นอกจากนั้นเมื่อพัฒนาเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากผู้ป่วยด้วยโรคพันธุกรรมร่วมกับเทคโนโลยีการปรับแต่งพันธุกรรมเพื่อแก้ไขที่กลายพันธุ์ให้เป็นปกติและใช้เป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดสำหรับพัฒนาไปเป็นเซลล์ร่างกายที่จำเพาะเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยเองได้อีกด้วย

ที่เซลล์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยจะกระตุ้นและชี้นำการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เพื่อไปทำลายเชื้อโรคและเซลล์มะเร็งต่างๆ การนำที่เซลล์จากเลือดมากระตุ้นและเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งและโรคติดเชื้อต่างๆ (adoptive T-cell therapy) จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพื่อใช้ในการพัฒนาการรักษาแบบเซลล์บำบัด อย่างไรก็ตามการนำไปใช้นั้นยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้เวลาในการสร้างและเตรียมที่เซลล์ที่มีความจำเพาะต่อโรคของผู้ป่วย (antigen-specific) ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการรักษา ดังนั้นถ้าสามารถเตรียมที่เซลล์ที่มีความจำเพาะต่อโรคได้อย่างรวดเร็วและเพียงพอต่อการใช้งาน จะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปัจจุบันมีรายงานการสร้างที่เซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ซึ่งเป็นแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดที่ขยายปริมาณได้อย่างไม่จำกัด ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความหวังว่าจะสร้างที่เซลล์สำรองในปริมาณมากไว้ใช้ในการวิจัยและการรักษา เช่น ออกแบบที่เซลล์ที่มีประสิทธิภาพทำลายเซลล์มะเร็งหรือเชื้อโรคต่างๆ ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิด severe combined immunodeficiency (SCID-X1) และใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งสารพันธุกรรม (genome editing) เพื่อแก้ไขความผิดปกติของยีน IL-2R และพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่แก้

ยืนสำเร็จให้เป็น lymphocytes ทั้งทีเซลล์ บีเซลล์ และเอ็นเคเซลล์ ได้ ดังนั้นการสร้างทีเซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากผู้ป่วย จึงมีความสำคัญต่อการศึกษากลไกการเกิดโรคทั้งโรคมะเร็ง โรคติดเชื้อ และโรคที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน อันจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคต่างๆ แบบเซลล์บำบัดเฉพาะบุคคลได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีมาตรฐานในการสร้างทีเซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของมนุษย์และเชื้อโรค โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1. เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes โดยใช้ Sendai virus เป็นตัวนำพายีน
2. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติความเป็น pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างได้
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ให้พัฒนาไปเป็น T lymphocytes
4. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของ T lymphocytes ที่สร้างได้

วิธีการดำเนินการ

โครงการนี้ประกอบไปด้วยแผนการวิจัยย่อย 2 ส่วนคือ

1. การสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างได้ โดยจะทดสอบความเป็นพลูริโพเทนท์ (pluripotency) ความสามารถที่จะเจริญไปเป็นเนื้อเยื่อทั้งสามชั้นในงานทดลอง (in vitro differentiation) และตรวจสอบจำนวนโครโมโซม (karyotyping analysis)
2. การสร้าง T lymphocytes จากเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs โดยจะหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดและทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่สร้างได้ เช่น การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์

ผลการดำเนินงาน

1. การสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด STiPSCs ที่สร้างได้

ผู้ทำการทดลองทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes จากผู้บริจาคที่เป็น HLA-A2+ ด้วย T Cell TransAct™ (Miltenyi Biotec) จากนั้น reprogram เซลล์ให้เป็น iPSCs ด้วย Cytotune 2.0 Sendai virus (ThermoScientific) ซึ่งผู้ทำการวิจัยพบว่ามีโคลนี iPSCs เกิดขึ้นหลายโคลนี และได้ทำการเลือก STiPSC01 (รูปที่ 1a) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุด คือ มีการแสดงออกของโปรตีน pluripotency markers ทุกชนิด ได้แก่ TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, OCT4 และ NANOG (รูปที่ 1b), มีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อเอ็มบริโอทั้ง 3 ชั้น ได้แก่ ectoderm (nestin และ Tuj1), mesoderm (SMA) และ endoderm (AFP) (รูปที่ 1c), ไม่มีการปนเปื้อนของ mycoplasma (รูปที่ 1d) และหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์โคลนี STiPSC01 จนถึง passage ที่ 15 ผู้วิจัยได้สกัด RNA จากเซลล์โคลนีดังกล่าวเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ Sendai viral vector ภายในเซลล์ ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่าเซลล์โคลนีดังกล่าวไม่มี Sendai viral genome หลงเหลืออยู่ภายในเซลล์ (รูปที่ 1e) ผลจากการวิเคราะห์โครโมโซมของเซลล์โคลนี STiPSC01 ด้วยเทคนิค Karyotyping แสดงให้เห็นว่าเซลล์โคลนี STiPSC01 ที่สร้างขึ้นมีจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมเป็นปกติ (รูปที่ 1f) และผู้วิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ short tandem repeat (STR analysis) ในจีโนมของเซลล์โคลนี STiPSC01 ทั้งหมด 16 ตำแหน่ง เปรียบเทียบกับจีโนมของผู้บริจาค พบว่าจำนวน short tandem repeat ทั้ง 16 ตำแหน่งในเซลล์โคลนี STiPSC01 ตรงกับจีโนมของผู้บริจาค จึงสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างขึ้นมีสารพันธุกรรมเหมือนกับผู้บริจาค (รูปที่ 1g)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็น iPSCs ดังที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่า STiPSC01 มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปทดลองในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Hematopoietic stem cells) จากเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs

หลังจากผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte ได้เป็นผลสำเร็จ ผู้วิจัยจึงเริ่มหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด STiPSC01 ให้เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด หรือ hematopoietic stem cells (HSCs) โดยอ้างอิงจากวิธีของ Duan และคณะ[18] ซึ่งเป็นการเหนี่ยวนำการเจริญของ iPSCs ไปเป็น mesoderm (ME) และ hemogenic endothelial (HE) ด้วย glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor (CHIR99021) จากนั้นจึงเติม cytokines และ growth factors ชนิดต่างๆ ในวันเวลาที่จำเพาะเพื่อเหนี่ยวนำการเจริญของ HE ไปเป็น เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (HSCs) ต่อไปดังรูปที่ 2

ผู้วิจัยทำการเลี้ยง STiPSC01 ใน Essential 8 medium เพื่อให้เซลล์มีจำนวนเพียงพอต่อการเหนี่ยวนำขั้นต่อไป ซึ่ง STiPSC01 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเห็นได้จากโคโลนีที่ใหญ่ขึ้นจาก Day-1 ถึง Day 0 จากนั้นเมื่อเปลี่ยนอาหารมาเป็น Differentiation medium ที่มี CHIR99021 เป็นระยะเวลา 2 วัน และเปลี่ยนอาหารเป็น Differentiation medium ที่ไม่มี CHIR99021 แต่ผสม VEGF, FGF2 และ SB431524 ที่วันเวลาที่เหมาะสมดังรูปที่ 2 พบว่า เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจนมีลักษณะคล้ายกับ cobblestone ที่ Day 5 จากนั้น เริ่มมีเซลล์แขวนลอย (floating cells) ที่หลุดขึ้นจากเซลล์ยึดเกาะ (adherent cells) เกิดขึ้นดังลูกศรชี้ใน Day 8 (รูปที่ 3) และพบว่าปริมาณของเซลล์แขวนลอยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นใน Day 12 (รูปที่ 3)

ผู้วิจัยเก็บเซลล์ในวันที่ 3, 5, 8 และ 12 มาวิเคราะห์การแสดงออกของ mesoderm, endothelial และ HSC markers ด้วยเทคนิค flow cytometry analysis พบว่าเซลล์ในวันที่ 5 มีการแสดงออกของ mesoderm (CD34+KDR+) 69.6 % และ มีการแสดงออกของ endothelial 63.2 % ส่วนเซลล์แขวนลอยที่เกิดขึ้นใน Day 8 และ 12 พบว่ามีการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (HSCs) (CD34+ CD43+) มากถึง 56.6% และ 45.8% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บางส่วนมีการเจริญพัฒนาไปจนถึงระยะ mature HSCs (CD34+ CD45+) เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปถึง Day 12 (รูปที่ 4)

จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ STiPSC01 สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในระยะ HSCs ได้โดยใช้เวลาเพียง 8 วันเท่านั้น ซึ่งผู้วิจัยให้ชื่อเรียก HSCs ที่ได้จากการเหนี่ยวนำพัฒนามาจาก STiPSC01 ว่า STiHSCs

3. การสร้าง T lymphocytes จากเซลล์ต้นกำเนิด STiHSCs

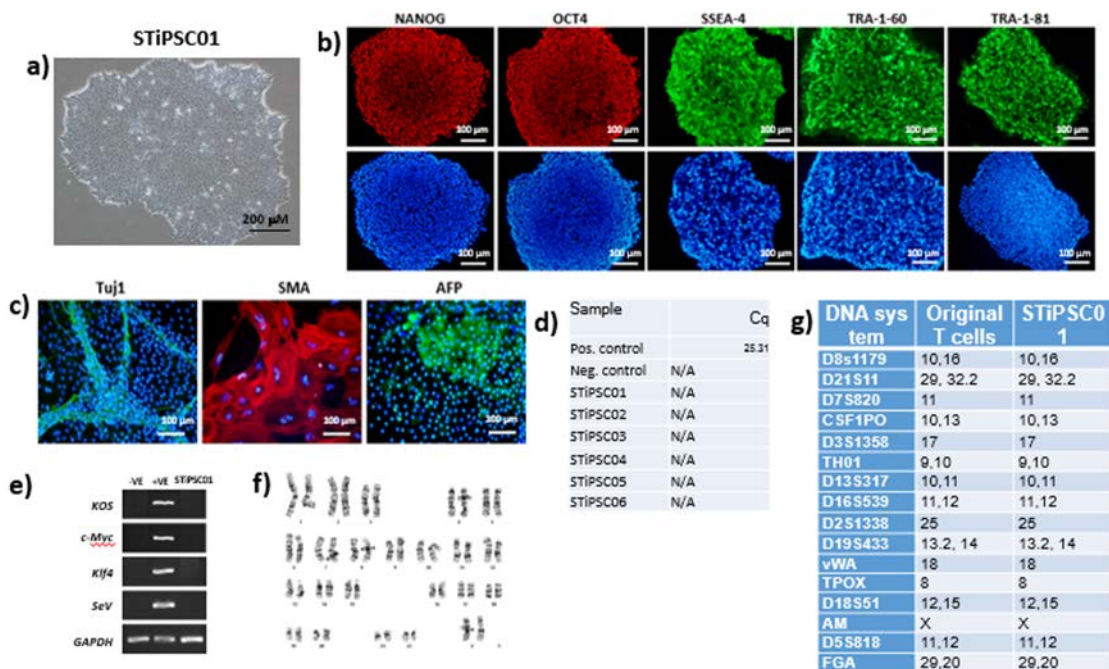
หลังจากผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (STiHSCs) จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด STiPSC01 ได้สำเร็จแล้ว ขั้นต่อไปผู้วิจัยได้นำเซลล์ที่สร้างขึ้นได้ มาเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes โดยอ้างอิงตามวิธีการของ Maeda และคณะ [20]

ผู้วิจัยเริ่มจากเลือกเซลล์ในวันที่ 5 ของการเจริญพัฒนาซึ่งอยู่ในระยะ hemogenic endothelium progenitors (HE) และเซลล์แขวนลอยในวันที่ 8 ซึ่งอยู่ในระยะ hematopoietic stem cells (HSCs) มาเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยง OP9-DL1 ใน 6-well plate ด้วยอาหารที่ผสม IL-7, Flt-3L และ SCF เป็นระยะเวลา 35 วัน โดยเซลล์จะถูกระบุ subpassage ไปยังเซลล์ที่เลี้ยงในหลุมใหม่ ทุก ๆ 7 วัน (รูปที่ 4)

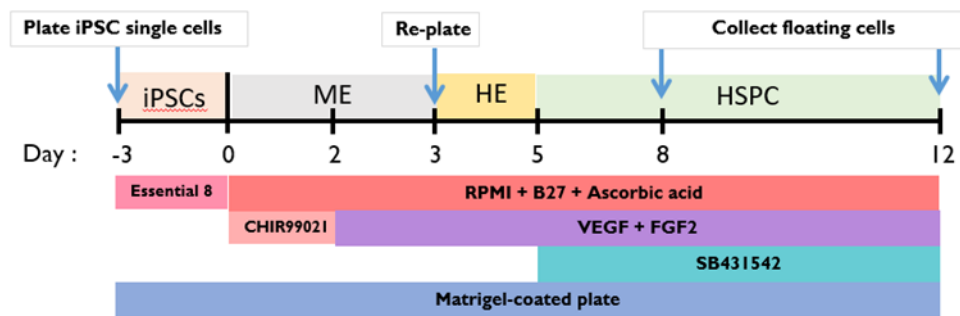
ในวันที่ 14, 21, 28, และ 35 เซลล์จะถูกระบุและแบ่งบางส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค Flow cytometry analysis ผลการทดลองพบว่า เซลล์ลอยในวันที่ 8 ไม่สามารถอยู่รอดเมื่อนำมาเลี้ยงกับเซลล์ที่เลี้ยงได้ มีเพียงแค่เซลล์ในระยะ HE ใน

วันที่ 5 ที่สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte ได้ตั้งรูปที่ 5 โดยช่วง 14 วันแรกของการเจริญพัฒนา เซลล์มีการแสดงออกของ marker CD45, CD7, และ CD5 ซึ่งเป็น marker ของการเจริญพัฒนาไปเป็น T lymphocytes ในระยะต้น ประกอบกับการแสดงออกของ CD34 ที่ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์เริ่มออกจากกระยะเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ส่วนในวันที่ 14, 21, 28 และ 35 ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการเจริญพัฒนาของเซลล์เป็นไปตามพัฒนาการของ T lymphocytes ในร่างกาย โดยเริ่มจากมีแสดงออกของ CD3 และ T cell receptor (TCR) เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงของ CD4 และ CD8 แสดงให้เห็นว่าเซลล์เริ่มต้นจากกระยะ double negative (DN) คือไม่มีการแสดงออกของ CD4 และ CD8 หลังจากนั้นเซลล์เริ่มเจริญพัฒนาเข้าสู่กระยะ double positive (DP) ที่มีการแสดงออกของ CD4 และ CD8 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ Maeda และ คณะ

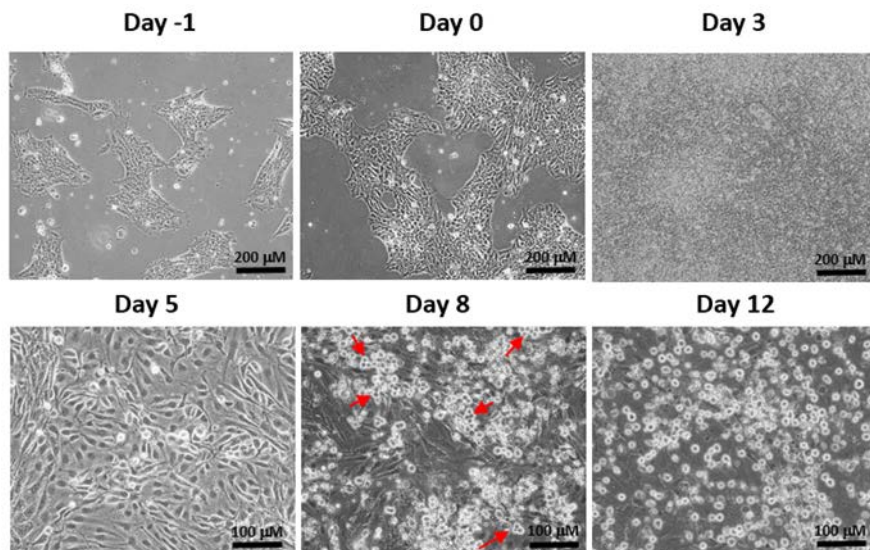
จากการทดลองในขั้นนี้จะเห็นได้ว่า ผู้วิจัยสามารถเหินยวนการเจริญพัฒนาของ STiHSCs ไปเป็น T lymphocytes ได้ถึงกระยะ double positive ซึ่งการเหินยวนนี้อีกเพียง 1 ขั้นตอนเท่านั้นจึงจะได้ T lymphocytes ที่สมบูรณ์ในที่สุด ซึ่งผู้วิจัยต้องทำการทดลอง และหาวิธีเพิ่มจำนวนเซลล์ในกระยะ double positive เพื่อเหินยวนให้เกิด T lymphocytes ที่สมบูรณ์ต่อไป



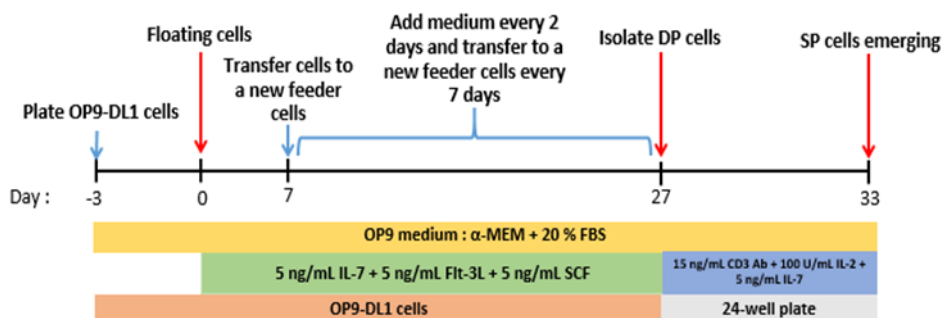
รูปที่ 1.การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็น iPSCs ของเซลล์ต้นกำเนิด STiPSC01 a) แสดงลักษณะของ STiPSC01 โคโลนี b) การแสดงออกของโปรตีน pluripotency markers c) ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็น ectoderm (nestin และ Tuj1), mesoderm (SMA) และ endoderm (AFP) d) ผลการตรวจ mycoplasma e) การแสดงออกของ Sendai viral vector ภายในเซลล์ f) Karyotyping แสดงจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมของเซลล์ g) short tandem repeat (STR analysis) ในจีโนมของ STiPSC01 เปรียบเทียบกับจีโนมของผู้บริจาค



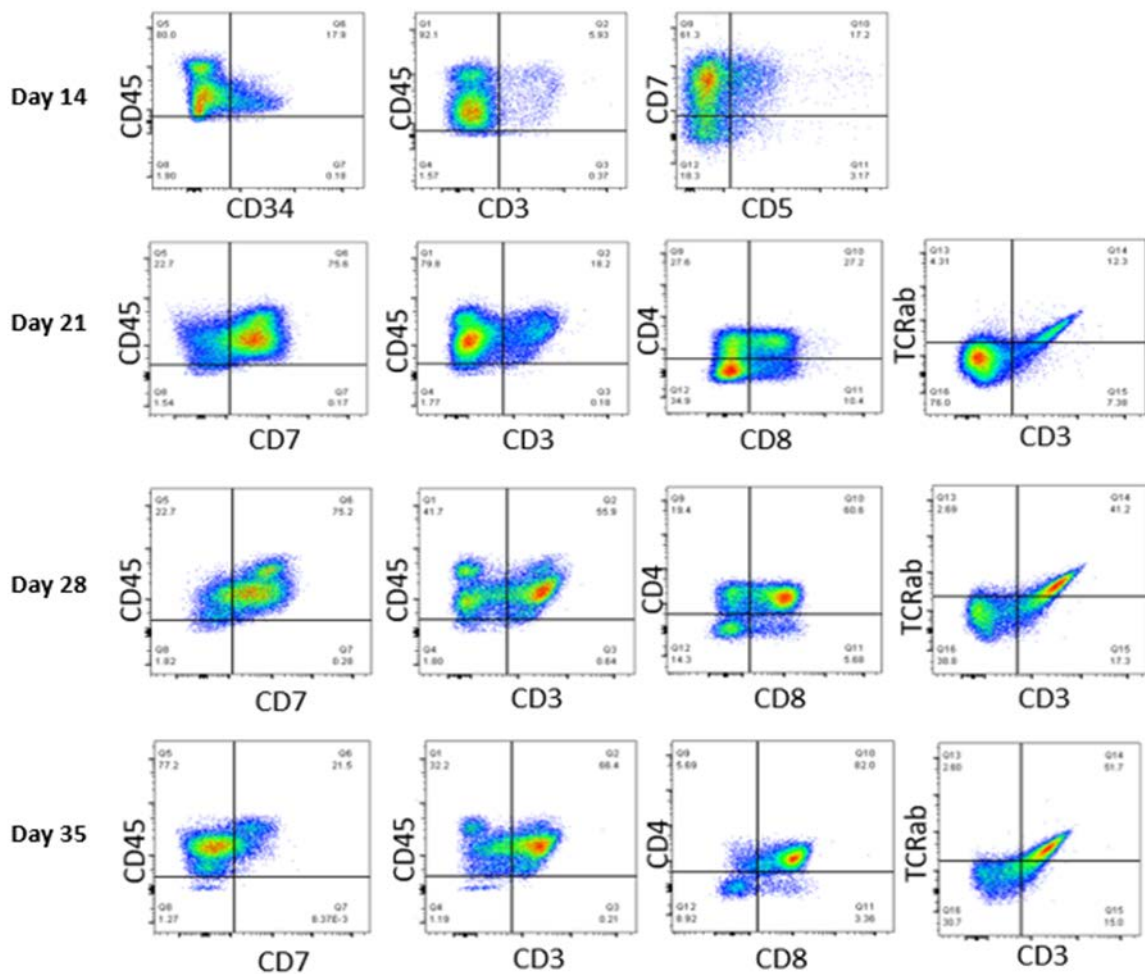
รูปที่ 2. แสดงวิธีการเหนี่ยวนำ iPSCs ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (HSCs) iPSCs จะถูกเลี้ยงใน plate ที่ถูกเคลือบด้วย Matrigel ตลอดกระบวนการเหนี่ยวนำ โดยจะใส่สารเหนี่ยวนำ, cytokines และ growth factors ชนิดต่าง ๆ ในเวลาที่จำเพาะเหมาะสม จากนั้นเซลล์เกาะและเซลล์ลอยจะถูกเก็บในวันที่ 3, 5, 8 และ 12 เพื่อไปทำการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์และวิเคราะห์การเจริญพัฒนาของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 3. แสดงลักษณะของ STiPSC01 ที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็น Mesoderm (Day3), Hemogenic endothelial (Day 5) และเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่มีลักษณะเป็นเซลล์ลอย (HSCs) (Day 8 และ 12) หลังจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีการใส่สารเหนี่ยวนำ ลูกศรสีแดงแสดงการเกิดขึ้นของ HSCs ที่หลุดขึ้นจาก Hemogenic endothelials.



รูปที่ 4. แสดงวิธีการเหนี่ยวนำ STiHSC ไปเป็น T lymphocytes



รูปที่ 5. Flow cytometry analysis แสดงลักษณะการแสดงออกโปรตีนบนผิวของ Day 5 HE ที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็น T lymphocytes ที่ระยะเวลา 14, 21, 28 และ 35 วัน ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง

สรุปผลงานที่ได้จากโครงการ

Quartile 1

คณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้

1. **Wattanapatnitch, M.,** Ritthaphai, A., Park, C., Boonkaew, B., Netsrithong, R., **Pattanapanyasat, K.,** Limsiri, P., Vatanashevanopakorn, C. (2018) Generation of a human induced pluripotent stem cell line (MUSli001-A) from caesarean section scar fibroblasts using Sendai viral vectors. Stem Cell Res, 27:105-8.
2. Netsrithong, R., Promnakhon, N., Boonkaew, B., Vatanashevanopakorn, C., **Pattanapanyasat, K., Wattanapanitch, M.** (2019) Generation of two induced pluripotent stem cell lines (MUSli011-A and MUSli011-B) from peripheral blood T lymphocytes of a healthy individual. Stem Cell Res, 39:101487

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ใช้ทุนวิจัยนี้สนับสนุนงานวิจัยเพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs จากเซลล์รากผมและเซลล์ปัสสาวะของผู้บริจาคที่มีสุขภาพดีและเซลล์ผิวหนังจากผู้ป่วยโรค

Spinocerebellar ataxia type 3 เพื่อใช้เป็นแบบจำลองสำหรับศึกษากลไกการเกิดโรคและตีพิมพ์ผลงานวิชาการในวารสารวิชาการระดับนานาชาติดังรายละเอียดต่อไปนี้

3. Boonkaew, B., Tapeng, T., Netsrithong, R., Vatanashevanopakorn, C., **Pattanapanyasat, K., Wattanapanitch, M.** (2018) Induced pluripotent stem cell line MUSli006-A derived from hair follicle keratinocytes as a non-invasive somatic cell source. Stem Cell Res, 31:79-82.
4. Ritthaphai, A., **Wattanapanitch, M.**, Pithukpakorn, M., Heepchantree, W., Soiampornkul, R., Mahaisavariya, P., Triwongwaranat, D., **Pattanapanyasat, K.**, Vatanashevanopakorn, C. (2018) Derivation of an induced pluripotent stem cell line (MUSli004-A) from dermal fibroblasts of a 48-year-old spinocerebellar ataxia type 3 patient. Stem Cell Res, 30:113-6.
5. Boonkaew, B., Thummavichit, W., Netsrithong, R., Vatanashevanopakorn, C., **Pattanapanyasat, K., Wattanapanitch, M.** (2018) Establishment of an integration-free induced pluripotent stem cell line (MUSli005-A) from exfoliated renal epithelial cells. Stem Cell Res, 30:34-7.
6. **Wattanapanitch, M.** (2019) Recent updates on induced pluripotent stem cells in hematological disorders. Stem Cells International, <https://doi.org/10.1155/2019/5171032>.

Bioinformatics and Data Management for Research

หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันการพัฒนาของเทคโนโลยีการหาลำดับเบสแบบใหม่ (Next-Generation Sequencing) สามารถให้ผลการหาลำดับเบสที่มีจำนวนมากและมีความซับซ้อนมากขึ้น ดังนั้นระบบคอมพิวเตอร์พื้นฐานที่ใช้สำหรับจัดการและวิเคราะห์ข้อมูลจำเป็นต้องพัฒนามากขึ้นเพื่อรองรับการวิเคราะห์ข้อมูลได้ถูกต้องและรวดเร็ว การจัดการข้อมูลลำดับเบสทั้งระดับ Whole genome Exome หรือ Transcriptome จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการจัดเก็บขนาดใหญ่ และระบบการคำนวณที่มีกำลังการประมวลผลสูง การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสขนาดใหญ่โดยใช้ระบบพื้นฐานสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ติดตั้งในองค์กร (Local Computer Infrastructure) ที่มีประสิทธิภาพ ไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ข้อมูล ทำให้เกิดการใช้ทรัพยากรของระบบการประมวลผลจำนวนมาก และมักจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ข้อมูล กรณีเช่นนี้มักจะทำให้เกิดข้อขัดแย้งกับโครงการที่มีขนาดเล็กกว่า ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ทรัพยากรในการประมวลผลจำนวนมาก และจำเป็นต้องรับวิเคราะห์ข้อมูล แต่ต้องรอให้การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดใหญ่ ที่ใช้เวลาในการประมวลผลเสร็จก่อน การแก้ปัญหาโดยเพิ่มประสิทธิภาพ Local Computer Infrastructure สามารถทำได้ แต่ต้องใช้งบประมาณจำนวนมาก เนื่องจากระบบมีราคาสูง อีกทั้งการยังต้องเสียงบประมาณในการบำรุงรักษาและพัฒนาระบบต่อไป เพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในการดูแลระบบประมวลผลขนาดใหญ่ จำเป็นต้องใช้เจ้าหน้าที่ทางด้านเทคโนโลยีสารสนเทศในการทำงาน อย่างไรก็ตามการใช้งาน Local Computer Infrastructure ก็อาจเสี่ยงต่อสถานการณ์ที่มีช่วงเวลาที่ในองค์กรไม่มีความต้องการที่จะวิเคราะห์ข้อมูล ทำให้ระบบถูกตั้งทิ้งไว้ไม่ได้ใช้งานเลย ในทางกลับกันระบบอาจจะมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ ในการตอบสนองความต้องการของผู้ใช้ทั้งองค์กรหากต้องการวิเคราะห์ข้อมูลพร้อมกันในช่วงเวลาเดียวกัน สถานการณ์เหล่านี้เกิดมาจากความผันผวนของความต้องการใน

การใช้งานในแต่ละช่วง ซึ่งในการวิจัยที่ข้อมูลที่ต้องวิเคราะห์มักจะเป็นจำนวนมากเฉพาะในช่วงที่เริ่มต้นโครงการใหม่

วิธีการแก้ปัญหาที่ท้าทายเหล่านี้ทางหนึ่งคือการเช่าระบบคอมพิวเตอร์ตามปริมาณที่เราต้องการใช้ เช่น เช่าระบบการประมวลผลแบบกลุ่มเมฆ (Cloud computing) โดยตัว hardware ของระบบจะตั้งอยู่ในที่ใดที่หนึ่งขึ้นอยู่กับผู้ให้บริการที่เราเลือกใช้ และเราสามารถเข้าใช้งานระบบประมวลผลจากที่ไหนก็ได้โดยการลงทะเบียน (log in) ผ่านระบบอินเทอร์เน็ตเพื่อส่งข้อมูลที่จะวิเคราะห์เข้าไปในระบบและทำการวิเคราะห์ข้อมูล ในกรณีเช่นนี้ผู้ใช้งานจะชำระเงินค่าเช่าระบบตามขนาดของระบบประมวลผล และระยะเวลาใช้งานเท่าที่ต้องการเท่านั้น รวมถึงไม่ต้องกังวลในเรื่องของการดูแลรักษาและพัฒนาส่วน Hardware ของตัวระบบประมวลผลเลย เพราะจะเป็นหน้าที่ของผู้ให้บริการระบบเอง ประโยชน์อีกหนึ่งอย่างของกรณีนี้ คือระบบการประมวลผลแบบกลุ่มเมฆของผู้ให้บริการบางแห่ง จะเตรียมข้อมูลอ้างอิง (Reference data) จากฐานข้อมูลสาธารณะต่างๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมมาไว้ในตัวระบบประมวลผลแล้ว ทำให้สะดวกในการเรียกใช้และเข้าถึงข้อมูลที่เป็นเหล่านี้ได้ง่าย และทันทั่วๆไปที่โดยที่เราไม่ต้องดาวน์โหลดข้อมูลเหล่านี้มาเก็บไว้เอง ซึ่งทำให้ประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บเนื่องมาจากข้อมูลอ้างอิงเหล่านี้มีขนาดใหญ่มาก และมีการอัปเดตข้อมูลบ่อยครั้ง

นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวสารสนเทศต้องใช้บุคลากรที่มีความสามารถในการเลือกและใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างเหมาะสม โดยปัจจุบันจำนวนของข้อมูลลำดับเบสในระดับจีโนมถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเพิ่มขึ้นอย่างมาก อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้จนได้ผลข้อมูลในระดับที่ต้องการนั้นยังไม่พบว่าทำได้โดยง่ายในหลายๆ โครงการวิจัย ปัญหานี้ทำให้ลดความก้าวหน้าของงานวิจัยในโครงการที่ต้องใช้ข้อมูลประเภทนี้ แต่ขาดคนวิเคราะห์ข้อมูล หรือวิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม ดังนั้นการสร้าง pipelines และ workflows อัตโนมัติ ที่ผ่านการตั้งค่าโปรแกรมที่เหมาะสมเพื่อรองรับการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปแบบพื้นฐานทั่วไป หรือสามารถยืดหยุ่นให้ปรับค่าโปรแกรมเพื่อรองรับข้อมูลในรูปแบบเฉพาะสำหรับงานวิจัยบางประเภทได้ เพื่อให้การวิเคราะห์ข้อมูลในระดับจีโนมเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นมีประโยชน์อย่างมาก โดยปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ข้อมูลให้มีประสิทธิภาพอีกประการคือระบบพื้นฐานในการประมวลผลที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์ข้อมูลนั้นสำเร็จอย่างถูกต้องและรวดเร็วได้อีกด้วย

อันเนื่องมาจากการขยายตัวของบริการที่เริ่มมาจากการวิจัยมีความเป็นไปได้สูงขึ้น รวมทั้งในงานโครงการนี้เราสร้าง pipeline ในการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมที่มีประสิทธิภาพนั้น และด้วยปัจจุบันยังมีคนจำนวนไม่มากนักที่ปฏิบัติงานตามสถาบันด้านสุขภาพหรือโครงการวิจัยที่ใช้ข้อมูลจีโนม และสามารถใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศเพื่อจัดการและวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมได้จนเป็นงานประจำ ด้วยเหตุนี้ทีมวิจัยจึงเห็นว่าประโยชน์อีกอย่างหนึ่งที่จะได้จากโครงการนี้คือการเผยแพร่ความรู้โดยการเปิดอบรมวิธีการทำงานด้านชีวสารสนเทศกับข้อมูลจีโนมและการประยุกต์ใช้งานกับข้อมูลรูปแบบต่างๆ โดยใช้ pipeline ที่โครงการสร้างขึ้นให้กับนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ที่สนใจทั้งในและนอกสถาบัน

วัตถุประสงค์

1. สร้างการทำงานแบบสายท่อ (pipeline) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมากที่ได้จากเทคโนโลยี การหาลำดับเบสแบบใหม่ (next – generation sequencing) โดยในแผนงานที่วางเอาไว้มีทั้งหมดสาม pipelines สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสระดับ exome genome และ mitochondrial genome
2. เพิ่มขีดความสามารถในการประมวลผลและปฏิบัติงานของระบบชีวสารสนเทศ และนำมาใช้ร่วมกับ pipeline ที่สร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเฉพาะข้อมูลจากโครงการต่างๆ ในองค์กร ที่ได้มีการหาลำดับเบสไว้แล้วแต่ยังขาดผู้วิเคราะห์ข้อมูล

3. เผยแพร่ความรู้และ Pipeline ที่ได้สู่กลุ่มวิจัยต่าง ๆ ที่มีข้อมูลลำดับเบสจำนวนมากอยู่แล้วหรือวางแผนที่จะทำการหาลำดับเบสในอนาคต ทั้งภายในและภายนอกองค์กร

วิธีดำเนินการ

สร้าง pipeline สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส Exome และ Whole Genome

Pipeline สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลนี้พัฒนาจาก workflow ของ Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practice ของ Broad Institute ในส่วนของ Pre-processing และ Variant discovery จากนั้นจึงนำ Variants ที่ได้จาก GATK workflow มาดู function ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคในขั้นตอน Variant annotation และ Interpretation (รูปที่ 1) รายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. Pre-processing:

คือขั้นตอนที่ใช้จัดการกับข้อมูลลำดับเบสเพื่อคัดกรองข้อมูลที่มีคุณภาพไว้ใช้ในขั้นตอนการค้นหา variation (Variant discovery) โดยก่อนที่จะ map ข้อมูลลำดับเบสกับ reference sequence ในขั้นตอนแรก of pre-processing ใน figure 1 นั้น ข้อมูลลำดับเบสจะถูกตรวจสอบคุณภาพด้วยโปรแกรม FastQC โดยโปรแกรมจะสร้างกราฟแสดงภาพรวมของ “bases quality score” “ค่า GC content” “จำนวนเบส N” “ความยาวของ reads” และ “จำนวนของ duplicate sequence” ทำให้เห็นคุณภาพโดยรวมของข้อมูล และทราบว่าจำเป็นต้องตัดลำดับเบสที่ด้านปลายของ reads ตามค่า base quality score หรือไม่ในกรณีที่ base quality score ค่อนข้างต่ำที่ด้านปลายของ reads ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนต่าง ๆ ใน pre-processing ตาม workflow ต่อไป

2. Map to reference

ผลการหาลำดับเบสจะถูกเปรียบเทียบ (alignment) กับ reference sequence เพื่อ map แต่ละ read กลับสู่ตำแหน่งดั้งต้นบนจีโนมโดยใช้โปรแกรม BWA mem (Available at: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) ซึ่งไม่ได้เป็นโปรแกรมของ GATK

3. Mark duplicates

ในขั้นตอนการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Next-Generation Sequencing (NGS) ดีเอ็นเอต้นแบบเส้นเดียวอาจถูกอ่านลำดับเบสซ้ำ ๆ หลายครั้งทำให้ได้ผลการหาลำดับเบสที่เหมือนกันซ้ำ ๆ หลายเส้นที่เรียกว่า duplicate reads ซึ่งไม่ใช่ผลจริง และไม่ควรใช้ในการหา Variation ดังนั้นขั้นตอนการระบุลำดับเบสที่ซ้ำ (Mark duplicates) จะทำก่อนหา Variation โดยโปรแกรมที่ใช้คือ Picard (Available at: <https://broadinstitute.github.io/picard/command-line-overview.html>) ซึ่งไม่ได้เป็นโปรแกรมของ GATK โปรแกรมนี้จะระบุตำแหน่ง read ที่ซ้ำลงในไฟล์ผล alignment (SAM/BAM format) ให้เหลือเฉพาะตัวแทน read นั้นอย่างละหนึ่งเส้นโดยไม่ต้องเอา reads นั้น ๆ ออก แต่โปรแกรมอื่น ๆ ของ GATK ที่จะใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อ ๆ ไปจะสามารถรู้ตำแหน่ง reads ซ้ำที่ถูกระบุไว้และไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ขั้นตอนการ Mark duplicate นี้ไม่ควรใช้ในกรณีที่ข้อมูลลำดับเบสได้มาจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ตั้งใจ amplify จากบริเวณจำเพาะที่เดียว เช่น Amplicon sequencing

4. Base recalibration

ในขั้นตอนการระบุ Variation นั้น algorithm ที่ GATK ใช้จะขึ้นอยู่กับ quality score ของผลการหาลำดับเบสอย่างมาก แต่ quality score ที่ได้มาจากเครื่อง NGS อาจไม่ถูกต้องแม่นยำเพียงพอในการบอกคุณภาพของเบส ดังนั้นใน GATK workflow จึงมีขั้นตอน Base quality score recalibration (BQSR) โดยใช้โปรแกรม BaseRecalibrator ของ GATK ซึ่งใช้ Machine learning Algorithm ในการคำนวณค่า base quality score ใหม่ที่ถูกต้องมากขึ้นก่อนทำการระบุ variations

5. Variant Discovery:

คือการระบุตำแหน่ง Variations จากข้อมูล NGS หลังจากที่ได้ข้อมูลได้ผ่านการ cleaning และ map กับ reference sequence แล้ว ในส่วนนี้ประกอบด้วยสามขั้นตอน ดังนี้

6. Variant Calling (SNPs/Indels)

ในขั้นตอนนี้เป็นการระบุตำแหน่ง Variations โดยใช้โปรแกรม HaplotypeCaller ของ GATK โปรแกรมสามารถระบุได้ทั้ง Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) และ Insertions and Deletions (Indels) โดยโปรแกรมจะระบุ variation และให้ผล variation ในรูปแบบ Variant Calling Format (VCF) โดยใน GVCF mode โปรแกรมจะสร้างไฟล์ GVCF ซึ่งเป็น Intermediate variant file จากข้อมูลแต่ละตัวอย่างซึ่งจะสามารถนำไปรวมกับ GVCF file จากตัวอย่างอื่นได้ในขั้นตอนถัดไป ในกรณีที่ตัวอย่างในการวิเคราะห์มากกว่าหนึ่งตัวอย่าง

7. Joint Genotype

ในกรณีที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนมากจากหลายตัวอย่าง ข้อมูล Variations จากแต่ละตัวอย่างในไฟล์ GVCF จะสามารถรวมกันโดยใช้โปรแกรม GenotypeGVCFs ของ GATK มาเป็นไฟล์ VCF ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถช่วยเพิ่ม sensitivity ในการระบุ variation ได้ด้วย

8. Filter Variants

โปรแกรมสำหรับระบุ Variations ของ GATK มี sensitivity สูง ทำให้เพิ่มโอกาสในการระบุ real variations ได้มาก แต่ก็หมายความว่าอาจพบ false positive ได้มากเช่นกัน ดังนั้นขั้นตอนการคัดกรอง variations จึงจำเป็น ใน GATK จะใช้การคำนวณ variant quality score อีกครั้งที่เรียกว่า Variant Quality Score Recalibration (VQSR) ซึ่งใช้ Machine learning Algorithm ในการคำนวณ ขั้นตอนนี้ใช้โปรแกรมทั้งหมดสามโปรแกรมของ GATK ได้แก่ VariantFiltration, VariantRecalibrator และ ApplyRecalibration อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้ set ของ known variants และข้อมูลจำนวนมากเพื่อให้โปรแกรมได้เรียนรู้รูปแบบของ variations ที่ถูกและผิด ดังนั้นในกรณีที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างจำนวนน้อย หรือตัวอย่างที่ยังไม่มี model organism จะไม่สามารถทำ VQSR ได้ หลังจากผ่านขั้นตอนนี้จะได้ Variations ที่พร้อมนำไปหา function ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคต่อไป

9. Variant Annotation

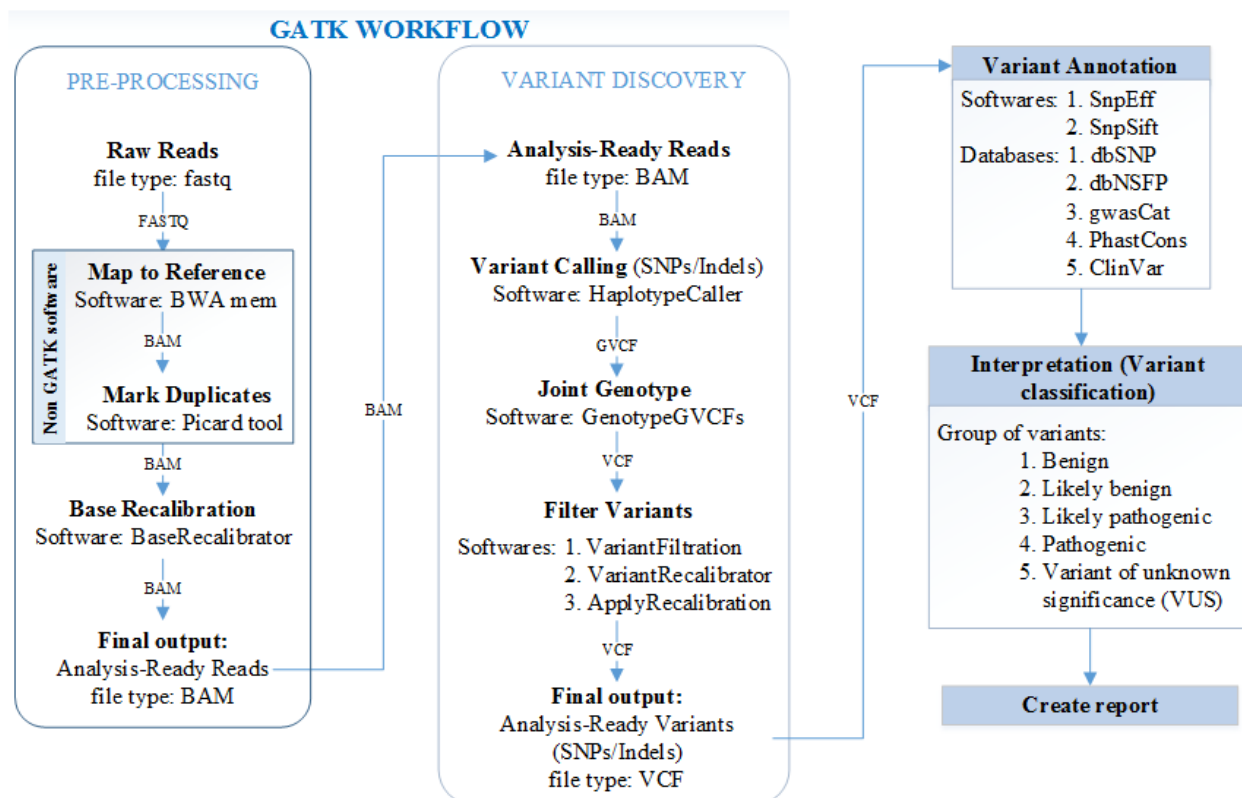
หลังจากได้กลุ่มของ Variations ที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนก่อนหน้ามาเรียบร้อยแล้ว Variations แต่ละอันจะนำไปเทียบหาในฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลความสัมพันธ์ของ variants กับการเกิดโรคที่ได้มีการศึกษาและรายงานไว้แล้วในการทดลองต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม SnpEff และ SnpSift เทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล dbSNP, dbNSFP, gwasCat, PhastCons และ ClinVar

Interpretation

ตีพิมพ์แล้วเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ variant นั้นต่อการเกิดโรค จะถูกนำมาพิจารณาตามเกณฑ์ที่วางไว้โดย American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Standards and Guidelines เพื่อจัดกลุ่ม variation ผล Variation และข้อมูล annotation ของ variant แต่ละอัน ร่วมด้วยการค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องอยู่ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ตามระดับความรุนแรงต่อการเกิดโรค ได้แก่

- Variant with Benign
- Variant with Likely benign
- Variant with Likely pathogenic
- Variant with Pathogenic
- Variant with Uncertain Significant (VUS)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนเดียวที่ยังไม่สามารถดำเนินการโดยอัตโนมัติได้ ผู้วิเคราะห์ต้องสืบค้นหาข้อมูลและพิจารณาข้อมูลของแต่ละ variation และเลือก variation ที่น่าสนใจมารายงาน ส่วนขั้นตอน Pre-processing จนถึง Variant annotation ถูกสร้างให้สามารถรันได้อัตโนมัติบนโปรแกรม Docker ซึ่งจะจำลองระบบการทำงาน ที่สามารถยกทั้งระบบที่จำลองไว้ไปรันที่ใดก็ได้ที่ติดตั้งโปรแกรม Docker อยู่



รูปที่ 1. Flowchart แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome และ Whole genome
ติดตั้งระบบ Cloud computing

บริษัทที่ให้บริการระบบ Cloud computing ที่ถูกเลือกใช้ในโครงการนี้คือบริษัท DigitalOcean (<https://www.digitalocean.com/>) โดยเหตุผลที่เลือกใช้ระบบ Cloud computing ของ DigitalOcean เพราะมีระบบการติดตั้งที่ใช้งานได้ง่าย มีระบบปฏิบัติการ (Operating System) ที่หลากหลายทั้งระบบ Windows และ Linux พร้อมทั้งระบบความปลอดภัยในการ log in เข้าสู่ระบบ (Authentication) ที่ผู้ใช้งานสามารถเลือกได้ตามความเหมาะสมของการใช้งาน ระบบ Cloud ที่ทำการติดตั้งและเปิดใช้แต่ละอันใน DigitalOcean จะถูกเรียกว่า Droplet

Pipeline ที่สร้างขึ้นจะรันในระบบปฏิบัติการ Linux Ubuntu ภายใต้โปรแกรม Docker โดยทำการติดตั้งแค่โปรแกรม Docker (<https://www.docker.com/>) และโปรแกรมพื้นฐานหลักๆ สำหรับดาวน์โหลด pipeline ลงใน Droplet แต่ไม่ต้องติดตั้งโปรแกรมอื่นๆ ที่จะถูกเรียกใช้ใน pipeline ลงในระบบเลย โดยก่อนทำการติดตั้ง Droplet ในระบบของ DigitalOcean ผู้ใช้ต้องทำการสมัครสมาชิกและ Login เข้าสู่ระบบของ DigitalOcean ผ่านหน้า Homepage (<https://www.digitalocean.com/>) ของระบบก่อน จากนั้นสามารถดำเนินการติดตั้งระบบ Droplet ตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ใน Link วิธีการติดตั้ง Droplet ที่ <https://www.digitalocean.com/docs/droplets/how-to/create/> ขั้นตอนการติดตั้งเฉพาะที่จำเป็นได้สรุปไว้ดังต่อไปนี้

1. หลังจาก Log in เข้าสู่ระบบ DigitalOcean แล้ว เลือกที่ปุ่ม "Create" ด้านขวาบนของหน้าเว็บไซต์ จากนั้นเลือก "Droplets" จาก Drop-down menu เพื่อเปิดหน้าเพจสำหรับสร้าง Droplet
2. เลือก Image ของระบบปฏิบัติการที่จะติดตั้ง โดยในแถบ "Distributions" เลือก "Ubuntu 18.04.2x64"
3. เลือกประสิทธิภาพของระบบประมวลผลที่เหมาะสมกับการปฏิบัติงาน โดยประสิทธิภาพขั้นต่ำของระบบประมวลผลที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome คือ RAM 8 Gb, 4 CPU ความจุ 160 Gb จากแถบ "Standards" เลือกติดตั้ง Droplet ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าหรือเท่ากับขั้นต่ำนี้ในการใช้งาน Pipeline
4. เลือก "Datacenter region" คือเลือก Sever ที่จะสร้าง Droplet ไว้ โดยในโครงการนี้จะเลือก "Singapore" เพราะเป็น Server ที่อยู่ใกล้ประเทศไทยที่สุด ทำให้เมื่อทำการ Download/Upload ข้อมูลจากเครื่องที่ประเทศไทยไปรัน pipeline บน Droplet จะใช้เวลาน้อยที่สุด
5. เลือกวิธีการ Log in ใช้งาน Droplet (Authentication) โดยมีสองวิธีให้เลือกคือ

- a. SSH keys วิธีนี้ผู้ใช้งานต้องสร้าง SSH Keys และโดยระบุ Password ที่จะใช้ Log in Droplet จากเครื่องที่จะใช้งาน Droplet ก่อน แล้วจึงนำ SSH Keys ที่สร้างไว้มาใส่ในขั้นตอน Authentication ในตอนสร้าง Droplet โดยวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ปลอดภัยที่สุดแต่อาจจะไม่สะดวกนักหากผู้ใช้งานต้องการ Log in เข้า Droplet จากเครื่องต่าง ๆ เพราะวิธีนี้ผู้ใช้งานจะสามารถ Log in เข้า Droplet ได้ผ่าน secure shell จากเครื่องที่ระบุไว้ได้เพียงเครื่องเดียวเท่านั้น
- b. One-time password วิธีนี้ ระบบ DigitalOcean จะส่ง password แรกเข้าของ Droplet ที่ผู้ใช้งานสร้างเสร็จเข้าสู่ Email ที่ผู้ใช้งานระบุไว้ เมื่อผู้ใช้งานเปิดเข้าใช้ Droplet ผ่าน Secure shell ครั้งแรกโดยใช้ password ที่ส่งเข้าไปใน Email ระบบจะบังคับให้ผู้ใช้งานเปลี่ยน password ใหม่ทันที จากนั้นการใช้งาน Droplet ในครั้งต่อไป ผู้ใช้งานสามารถ Log in เข้า Droplet ผ่าน Secure shell จากเครื่องใดก็ได้โดยใช้ password ที่ตั้งใหม่นี้

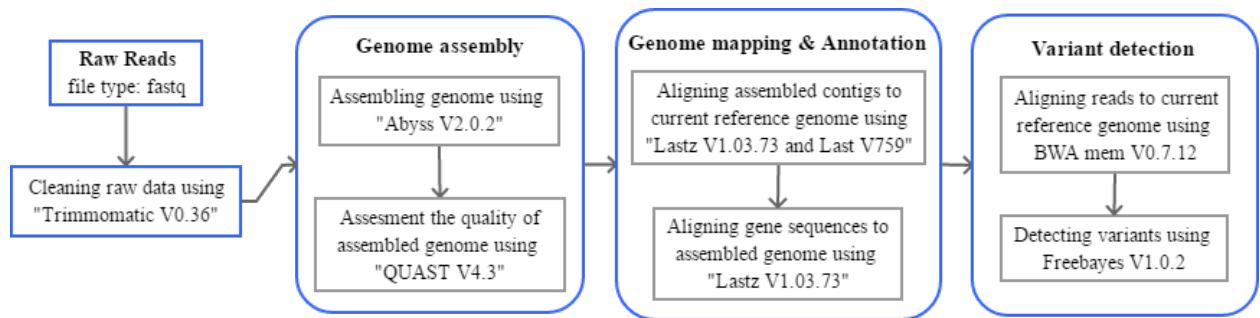
ติดตั้ง Pipeline ในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome บน Cloud computing

Pipeline สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome พร้อมวิธีการติดตั้งและวิธีใช้งานได้เผยแพร่ไว้ที่ GitHub (<https://github.com/si-medbif/exomeseq>) เมื่อเข้าไปตาม URL นี้จะพบรายชื่อของโปรแกรมหลักที่จำเป็นต้องติดตั้งก่อนจะทำการติดตั้ง pipeline พร้อมคำสั่งที่ใช้ในการติดตั้ง และขั้นตอนในการติดตั้งและใช้งาน pipeline โดยละเอียดพร้อมคำสั่งที่ต้องใช้ โดยเริ่มต้นผู้ใช้เพียงแค่ Log in เข้าสู่ Droplet ที่สร้างไว้ข้างต้น จากนั้นสามารถทำตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ใน Link GitHub ที่แสดงไว้ข้างต้นได้เลย

Pipeline ที่เผยแพร่ไว้บน Github นี้สามารถปรับใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของมนุษย์จากเครื่อง Next-Generation Sequencing ได้ทั้งแบบ Whole Exome, Whole Genome และ Targeted Gene Sequencing โดยการปรับเปลี่ยนข้อมูลในไฟล์ "target_regions.bed" ที่ใช้ในการกำหนดตำแหน่งบน Genome ให้ pipeline ทำการวิเคราะห์ข้อมูล

สร้างขั้นตอนสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลจาก De novo Whole Genome Sequencing

นอกจาก pipeline ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome และ Genome sequence แล้ว ทางคณะผู้จัดทำยังได้พัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลจาก De novo Whole Genome Sequencing ด้วย เนื่องจากโครงการที่ร่วมมือกับอาจารย์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการหาลำดับเบส Whole Genome ของสุนัขพันธุ์ชิวาวา (Chihuahua) ซึ่งยังไม่เคยมีจีโนมต้นแบบ (Reference genome) อยู่ใน Public database มาก่อน ข้อมูล Reference genome สุนัขที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI เป็นของสุนัขพันธุ์บ็อกเซอร์ โดยขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลจาก De novo Whole Genome Sequencing จะมีขั้นตอนที่แตกต่างกับการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Genome Re-Sequencing เนื่องจากกรณีของ De novo sequencing เป็นการหาลำดับเบสของ Genome ที่ยังไม่มีข้อมูล Reference genome ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ หรือของสายพันธุ์ที่ตรงกัน submit อยู่ในฐานข้อมูล ดังนั้นจึงไม่มี reference genome ที่ตรงกันในการ map reads กลับสู่ตำแหน่งเดิมบน genome ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้วิธี Genome assembly ในการประกอบชิ้นลำดับเบส (Reads) แต่ละชิ้นเข้าด้วยกันเพื่อให้เป็นชิ้นลำดับเบสขนาดใหญ่ (Contigs) หรือได้จีโนมที่สมบูรณ์ (Complete genome) จากนั้นจึงใช้ชิ้นลำดับเบสที่ประกอบได้มาเป็น Reference sequence ในการระบุตำแหน่ง Variations ต่อไป ลำดับขั้นตอนในการวิเคราะห์ข้อมูล De novo Whole Genome Sequencing แสดงอยู่ในรูปที่ 2



รูปที่ 2. Flowchart แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล De novo Whole genome sequencing

อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการวิเคราะห์ข้อมูลจาก De novo Whole Genome Sequencing นี้ยังไม่ได้พัฒนาเป็น Automated pipeline ดังเช่น pipeline สำหรับวิเคราะห์ Exome และ Genome sequence

ผลการดำเนินงาน

1. ได้ Automated pipeline สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสจาก Whole exome, Whole genome sequencing และ Targeted gene sequencing ที่สามารถติดตั้งและใช้งานบนระบบ Cloud computing ได้
2. ได้ขั้นตอนในการวิเคราะห์ข้อมูล De novo Whole genome sequencing
3. ได้เผยแพร่ความรู้ในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome Sequencing บนระบบ Cloud computing โดยใช้ Automated pipeline ที่สร้างขึ้นผ่านงานประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Cloud computing pipeline for Exome sequencing” ที่จัดขึ้นในวันที่ 10 – 11 กันยายน 2561

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. วิเคราะห์ข้อมูล Exome ที่ได้มีการหาลำดับเบสไว้แล้วด้วย pipeline ที่สร้างขึ้น
 - a. Pipeline สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล Exome ที่สร้างขึ้นนี้ได้ถูกนำมาปรับใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล Targeted Gene Sequencing โดยข้อมูล Targeted Gene Sequencing จะต่างจากข้อมูล Exome ตรงที่จะหาลำดับเบสเฉพาะบริเวณที่ครอบคลุม Gene ที่สนใจเท่านั้น แต่ข้อมูล Exome จะครอบคลุมลำดับเบสในส่วน Exon ของทุก Gene บน Genome ดังนั้นใน Pipeline สำหรับข้อมูล Exome จึงต้องมีการปรับเพื่อให้เหมาะสมกับข้อมูล Targeted Gene Sequencing มากขึ้นก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ข้อมูล โดยได้ใช้ Pipeline นี้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้หาลำดับเบสไว้แล้วของตัวอย่างจำนวน 16 ตัวอย่าง จาก “โครงการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยกลุ่มโรคพันธุกรรมที่สำคัญด้วยเทคนิคการอ่านรหัสดีเอ็นเอของกลุ่มยีนก่อโรคจำนวนมากในปฏิกิริยาเดียวกัน” หัวหน้าโครงการวิจัยคือ อ.นพ. ชรินทร์ลิ้มวงศ์ เพื่อหาลำดับเบสของ Genes ที่สนใจจำนวน 32 genes
2. สร้างความร่วมมือกับสถาบันอื่น
 - a. จาก Pipeline ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสที่สร้างขึ้นโดยการสนับสนุนจากโครงการวิจัยนี้ ทำให้สามารถสร้างความร่วมมือกับสถาบันอื่นได้เพิ่มขึ้น ขณะนี้มีโครงการที่ร่วมมือกับสถาบันอื่นจำนวนสองโครงการ ดังนี้
 - b. วิเคราะห์จีโนมข้าววัชพืช (Weedy Rice)

เป็นโครงการที่ร่วมมือกับอาจารย์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Genome ของข้าววัชพืชจำนวน 18 ตัวอย่าง ที่ผ่านการสกัด Genomic DNA และหาลำดับเบสด้วย Next-Generation Sequencing Technology และทำการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างของข้าววัชพืชที่มาจากปีเพาะปลูกที่ต่างกัน และพื้นที่เพาะปลูกที่ต่างกัน ข้อมูลบางส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์นี้ได้ไปนำเสนองานวิจัยในรูปแบบ poster ในงานประชุมระดับนานาชาติที่ประเทศสเปนแล้วในเดือนตุลาคมปี 2560

c. วิเคราะห์จีโนมสุนัขพันธุ์ชิวาวา (Chihuahua)

เป็นโครงการวิจัยที่ร่วมมือกับอาจารย์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Genome ของสุนัขพันธุ์ชิวาวา (Chihuahua) จำนวน 2 ตัวอย่าง เพื่อสร้าง Complete genome และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกมาอ้างอิงจากฐานข้อมูล Dog Genome, NCBI ซึ่งเป็นข้อมูลของสุนัขสายพันธุ์บ็อกเซอร์ และกำลังอยู่ในขั้นตอนการปรับแก้ Manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Scientific Data ต่อไป

3. เผยแพร่ความรู้และ pipeline ที่สร้างขึ้นสู่กลุ่มวิจัยต่าง ๆ ผ่านการประชุมเชิงปฏิบัติการ
4. จัดงานประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Cloud computing pipeline for Exome sequencing” จัดขึ้นในวันที่ 10 – 11 กันยายน 2561 เพื่อเผยแพร่ความรู้และเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์ข้อมูล Whole Exome Sequencing บนระบบ Cloud computing โดยใช้ Automated pipeline ที่สร้างขึ้น
5. มีแผนการที่จะจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Genomics on Cloud” ในเดือนเมษายน ปี 2563 เพื่อเผยแพร่ความรู้และเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์ข้อมูล Genome และการสร้าง Phylogenetic tree บนระบบ Cloud computing

Output ที่ได้จากโครงการ

Publication

Quartile 1

1. Liu X, Lu D, Saw WY, Shaw PJ, Wangkumhang P, Ngamphiw C, Fucharoen S, Lert-Itthiporn W, **Chin-Inmanu K**, Chau TN, Anders K, Kasturiratne A, de Silva HJ, Katsuya T, Kimura R, Nabika T, Ohkubo T, Tabara Y, Takeuchi F, Yamamoto K, Yokota M, Mamatyusupu D, Yang W, Chung YJ, Jin L, Hoh BP, Wickremasinghe AR, Ong RH, Khor CC, Dunstan SJ, Simmons C, Tongsima S, **Suriyaphol P**, Kato N, Xu S, Teo YY. 2017. Characterising private and shared signatures of positive selection in 37 Asian populations. Eur J Hum Genet doi:10.1038/ejhg.2016.181.

Quartile 2

1. Lert-Itthiporn W, Suktitipat B, **Grove H**, Sakuntabhai A, Malasit P, Tangthawornchaikul N, Matsuda F, **Suriyaphol P**. 2018. Validation of genotype imputation in Southeast Asian populations and the effect of single nucleotide polymorphism annotation on imputation outcome. BMC Med Genet 19:23.

Quartile 3

1. Jarupathirun P, Huang A, **Chin-inmanu K**, **Grove H**, Chinawirotpisan P, Phonpakobsin T, Yoon I, Fernandez S, Macareo L, Rutvisuttinunt W, **Suriyaphol P**. 2018. Simplified Host Dna Removal Procedure for Viral Detection in Clinical Blood Samples. Southeast Asian J Trop Med Public Health 49.
2. **Chin-Inmanu K**, Suttitheptumrong A, Sangsrakru D, Mairiang D, Tangphatsornruang S, Malasit P, **Suriyaphol P**. 2019. Complete Genome Sequences of Four Serotypes of Dengue Virus Prototype Continuously Maintained in the Laboratory. Microbiol Resour Announc 8.

Poster presentation

1. Rerkasem B, **Grove H**, **Chin-inmanu K**, Olsen K, L. Li, **Suriyapol P**, Jamjod S, Pusadee T, “Evolutionary dynamics of Thai weedy rice (*Oryza sativa f. spontanea*) genomic”, Plant Genome Evolution: Current Opinion Conference 2017, 1-3 October 2017, Sitges, Spain

2. **Chin-inmanu K**, Punyadee N, Mairiang D, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Panisadee A, **Suriyaphol P**. "Phenotypic Changes of Dengue Virus Infected Cells during Serial Passaging of C6/36 and Vero Cell Lines", TRF-OHEC Annual Congress 2018 (TOAC 2018), 10-12 January 2018, Petchaburi, Thailand

Manuscript in preparation

1. **Grove H**, **Chin-inmanu K**, **Suriyaphol P**, Khongchatee A, Suktitipat B, Surachetpong SD, Wangdee C. "Genome sequence of a Chihuahua (Canis familiaris) from Thailand".
Manuscript in preparation for submitting to "**Scientific Data**"

ภาคผนวก

กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

- การนำเสนอผลงาน และได้รับเชิญเป็นวิทยากรจำนวนทั้งสิ้น 60 ครั้ง
- การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

1. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการในประเทศ

1.1 ภายในมหาวิทยาลัยมหิดล

- คณะวิศวกรรมศาสตร์
- คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
- คณะวิทยาศาสตร์

1.2 ภายนอกมหาวิทยาลัยมหิดล

- จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- มหาวิทยาลัยนเรศวร
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- บริษัท X-Zell Biotec จำกัด (ภาคเอกชน)

2. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการต่างประเทศ

- University of Salford, Manchester
- Northwestern University Feinberg School of Medicine
- King's College London
- University of Florida College of Medicine
- Center for AIDS Research, Kumamoto University
- Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London
- University of Manchester
- Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School
- Università del Piemonte Orientale, Vercelli, Italy
- Saw Swee Hock School of Public Health, National University of Singapore
- London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), UK
- Graduate School of Medicine, Kyoto University
- Asia eHealth Information Network
- Faculty of Medicine, Faculty of Medicine Centre, Imperial College London

- การจัดประชุมวิชาการ/สัมมนา

1. การประชุม เรื่อง “Recent Advances in Genomics and Genetics 2016” ในระหว่างวันที่ 21-22 กันยายน 2559 ณ ห้อง conference room B hall 101&102 ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค (Bangkok International Trade & Exhibition Centre: BITEC))
2. การร่วมมือกับคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จัดการประชุมวิชาการประจำปีเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย ในหัวข้อ “A Special Symposium on Recent Advances in viral Immunology” ในวันพฤหัสบดีที่ 3 พฤศจิกายน 2559 ณ ห้องประชุม 5102 อาคารเวชชีวศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. การบรรยายพิเศษเรื่อง “A Day in the Life of a Mass Spec Core Facility” Specific Examples of How to Apply Metabolomics in Medical Research โดย Kym Francis Faull, Ph.D. ในวันที่ 27 ธันวาคม 2559 ณ ห้องประชุม 304 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ
4. การประชุมเชิงปฏิบัติการนานาชาติเรื่อง “Advanced R Programming Language for Data Analysis and Statistical Applications (R2017)” ในระหว่างวันที่ 17 – 19 มกราคม พ.ศ. 2560 เวลา 08.00 – 17.00 น. ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ
5. การประชุม เรื่อง “International Conference on Cancer Immunotherapy 2017” ในระหว่างวันที่ 20-21 กุมภาพันธ์ 2560 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
6. การประชุมวิชาการประจำปีของสมาคมไวรัสวิทยา เมื่อวันที่ 23-24 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ภายใต้ชื่อการบรรยายเรื่อง “Stem Cell-Derived Hepatocytes: An Alternative Host Model For Studying Dengue Pathogenesis and Therapy”

- การจัดตั้งหลักสูตรการเรียน การสอน

1. ปรัชญาคุณูปกต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ)
2. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวสารสนเทศทางการแพทย์ (หลักสูตรนานาชาติ)

- การจัดตั้งศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัย

1. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านวิจัยภูมิคุ้มกันบำบัดโรคมะเร็ง
2. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยฝุ่นเซลล์และเอ็กโซโซมในโรคต่างๆ
3. ศูนย์วิจัยเป็นเลิศด้านโรคไขข้ออักเสบ

- รางวัลที่ได้รับ

1. ศ. ดร.โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์
 - ได้รับรางวัลศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น ประจำปี 2559 จากสำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย สนับสนุนการวิจัยโครงการพินัยชีพ และการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ล้มเหลวในการต่อสู้เชื้อโรคชนิดต่างๆ ปี 2559 – 2562
 - ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปี 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2560 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทคบางนา กรุงเทพฯ ฯ
 - ได้รับรางวัลศิริราชเชิดชูเกียรติ ประจำปี 2559 จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในวันที่ 19 มิถุนายน 2560 กลุ่มผู้ได้รับรางวัลดีเด่นระดับมหาวิทยาลัย ระดับชาติ หรือนานาชาติ หรือเทียบเท่า
2. ศ. ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส
 - ได้รับรางวัลศิริราชเชิดชูเกียรติ ประจำปี 2559 จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในวันที่ 19 มิถุนายน 2560 กลุ่มผู้ดำรงตำแหน่งทางวิชาการเป็นศาสตราจารย์
3. คุณชูชัย เนตรฐกุล
 - ได้รับรางวัลการนำเสนอโปสเตอร์อันดับที่ 1 ในงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 20 วันที่ 15-17 มิถุนายน 2560 ณ โรงแรมโนโวเทล สุขุมวิท
4. Shilu Malakar
 - ได้รับรางวัลการนำเสนอแบบบรรยาย อันดับ 2 ในงานประชุม Graduate Research Forum 2017 วันที่ 26 & 29 พฤษภาคม 2560 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
5. คุณจุฑามาศ เทพมาลี
 - ได้รับรางวัลการนำเสนอแบบบรรยาย อันดับ 4 ในงานประชุม Graduate Research Forum 2017 วันที่ 26 & 29 พฤษภาคม 2560 ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
6. อ.ดร.ประภาพร จิงตระกูล
 - ได้รับรางวัล Presidents' Select Abstract Recognition Awarded, Young Investigator Travel Grant Recipient Awarded and Top Scoring Abstract Award จาก American Diabetes Association: 78th Scientific Sessions, Orlando, FL, June 22-26, 2018.
7. อ.ดร.รัตติยาภรณ์ กัลยา
 - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น ด้านปรีคลินิก หรือชีวการแพทย์จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2561 เมื่อวันที่ 1 สิงหาคม 2561 ณ ห้องประชุม อวยเกตุสิงห์ อาคารศรีสวรินทิรา ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
8. คุณชูชัย เนตรฐกุล
 - ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ดีเยี่ยม ในงานประชุม Recent Advances in Genomics and Genetics Conference 2018 (RAGG2018) "Innovative Genomics and Genetics" โรงแรมแอมบาสเดอร์ กรุงเทพฯ วันที่ 25-26 มิถุนายน 2561

9. ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น ด้านปรีคลินิก หรือชีวการแพทย์ จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2562 วันที่ 26 กันยายน 2562 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1
10. ดร.นิลุบล สิงห์โต - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น ด้านปรีคลินิก หรือชีวการแพทย์ จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2562 วันที่ 26 กันยายน 2562 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1
11. ผศ.ดร.เมธิจิต วัฒนพานิช - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของอาจารย์/นักวิจัยรุ่นใหม่ จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2562 วันที่ 26 กันยายน 2562 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1
12. อ.นพ.ปฐมพงษ์ อึ้งประเสริฐ - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของอาจารย์/นักวิจัยรุ่นใหม่ จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2562 วันที่ 26 กันยายน 2562 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1
13. อ.นพ.กรภัทร มยุระสาคร - ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นด้านนวัตกรรม จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2562 วันที่ 26 กันยายน 2562 ณ ห้องประชุม 101 อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (SiMR) ชั้น 1