

การแสดงออกของโปรตีนจากเอ็กซ์ตราเซลลูลาร์เวสิเคิลของเซลล์แมโครฟาจภายหลังการติดเชื้อ

Neisseria gonorrhoeae



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช

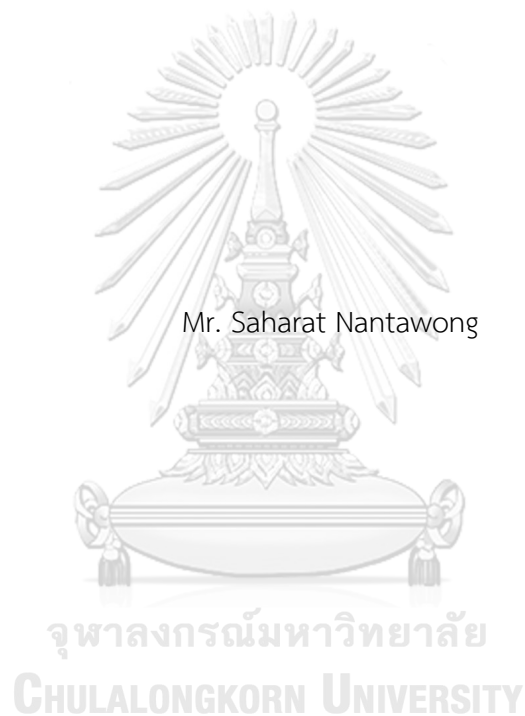
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PROTEIN EXPRESSION OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM MACROPHAGE CELLS
FOLLOWING *Neisseria gonorrhoeae* INFECTION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของโปรตีนจากเอ็กซ์ตราเซลล์ลาร์เวลีเคิลของเซลล์แมคโครฟาจภายหลังการติดเชื้อ <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
โดย	นายสหรัฐ นันทวงศ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รัชนิพร ตียะวิสุทธิ์ศรี)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิพย์)	

สทรฐฐ นันทวงค์ : การแสดงออกของโปรตีนจากเอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิลของเซลล์แมคโครฟาจภายหลังการติดเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*. (PROTEIN EXPRESSION OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM MACROPHAGE CELLS FOLLOWING *Neisseria gonorrhoeae* INFECTION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

โรคหนองในเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่เกิดจากการติดเชื้อไนซีเรีย โคโนเรีย (*Neisseria gonorrhoeae*) โดยมีอุบัติการณ์มากที่สุดในกลุ่มของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในประเทศไทยและทั่วโลก จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก ผู้ป่วยจำนวนมากไม่แสดงอาการของโรคโดยเฉพาะในผู้ป่วยหญิง ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบสืบพันธุ์ส่วนบนและนำไปสู่การเป็นหมันและการตั้งครรภ์นอกมดลูก พยาธิสภาพของโรคเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบโดยเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด การตอบสนองของเซลล์ต่อการติดเชื้อภายในเซลล์สามารถติดตามได้จากเอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิลที่ผลิตออกจากเซลล์แมคโครฟาจ เช่น การติดเชื้อไวรัส ติชมาเนีย และซัลโมเนลา ที่พบการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบโปรตีนของเซลล์แมคโครฟาจและของเชื้อภายในเซลล์ การปลดปล่อยเวสิเคิลนั้นจะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงาน กระบวนการอักเสบ และปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการแสดงออกและค้นหาโปรตีนในเอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิลจากเซลล์แมคโครฟาจทั้งชนิดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาว THP-1 ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสเชื้อ *N. gonorrhoeae* เข้าไปภายในเซลล์ ติดตามการแสดงออกของโปรตีนภายในเวสิเคิล และวิเคราะห์โปรตีนด้วย Tandem mass spectrometry ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบโปรตีนภายในเวสิเคิลที่ครอบคลุมโปรตีนของเซลล์แมคโครฟาจและของเชื้อ ทั้งยังพบว่ามีความแตกต่างกันทั้งชนิดและการแสดงออกจำเพาะในช่วงเวลาของการติดเชื้อ เมื่อนำผลวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศทั้ง Vesiclepedia, PANTHER และ Uniprot database ศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนภายในเวสิเคิล โปรตีนของมนุษย์ และโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตามลำดับ ทำให้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์และบทบาทต่อเซลล์แมคโครฟาจในช่วงเวลาที่ทดสอบ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาการตรวจติดตามเชื้อก่อโรคหนองในและองค์ความรู้ในความเข้าใจบทบาทของเอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิลต่อพยาธิสภาพและการดำเนินไปของโรคหนองใน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทาง ปลายมือชื่อนิสิต

จุลชีววิทยาทางการแพทย์และ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์และ วิทยาลัยภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2563 ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076755437 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Neisseria gonorrhoeae, Macrophages, Extracellular vesicles, Proteomics

Saharat Nantawong : PROTEIN EXPRESSION OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM MACROPHAGE CELLS FOLLOWING *Neisseria gonorrhoeae* INFECTION. Advisor: Asst. Prof. KHAEMAPORN BOONBUMRUNG, Ph.D.

Gonorrhea is a sexually transmitted disease caused by *Neisseria gonorrhoeae* infection, with the highest incidence among the sexually transmitted diseases in Thailand and worldwide. According to the World Health Organization report, many patients present no symptoms of diseases, especially females. Untreated patients cause infection of the upper reproductive system and lead to sterility and ectopic pregnancy. Pathology is caused by induced immune cell bundles and inflammatory processes. A macrophage is one of the essential cells in the innate immune system. The cellular response to intracellular infections can be traced from extracellular vesicles (EVs) produced by macrophages, such as Tuberculosis, Leishmania, and Salmonella infections which following the protein composition changing of macrophage and intracellular pathogens. The release of the vesicle affects the stimulate function, inflammatory, and modulate immune cells functions. This study focused on the expression protein and searched for proteins in extracellular vesicles from the macrophage, both infected and non-infected *N. gonorrhoeae*, by using the THP-1 lymphocytes. After stimulated THP-1 to macrophage cells, *N. gonorrhoeae* was phagocytosis into the cells. The expression of the protein from EVs was monitored and analyzed by tandem mass spectrometry. It was found the changing of the protein composition within the EVs that covers the proteins of macrophages and *N. gonorrhoeae*. Moreover, it was shown the differences in both types and specific expressions at the time of infection. The analysis results were compared with the bioinformatics database by Vesiclepedia, PANTHER, and Uniprot databases which study properties and functions of proteins within the vesicle, Human protein, and proteins of *N. gonorrhoeae* respectively. These would indicate the association and role in macrophages during the time course. The results of this study may contribute to the development of gonorrhea infection testing and understanding the role of EVs in pathogenesis and progression of the infection.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2020 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ซึ่งได้รับกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ติดตามการดำเนินงานวิจัย และให้ข้อคิดในด้านต่างๆ ในการทำงานวิจัยมาด้วยดีตลอด กระผมขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรากุล ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นริศรา จันทราทิพย์ ที่เสียสละเวลากรุณารับเป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ Assoc. Prof. Willa Huston, Dr. Matt padula, Mr. Joel Steele และ Mr. Rami Mazraani, School of Life sciences, Faculty of Science, University of Technology Sydney ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง เชื้อแบคทีเรีย สารเคมี การแนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาและให้คำปรึกษางานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณามอบทุนเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ทรงเจริญพระชนม์มายุครบ 72 พรรษา ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทุนไปทำวิจัยในต่างประเทศและบางส่วนจากทุนคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณามอบทุนอุดหนุนค่าธรรมเนียมพิเศษ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำแนวทางและให้คำปรึกษามาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่ให้ความรัก กำลังใจและให้คำปรึกษาด้วยดีมาโดยตลอด จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สหรัฐ นันทวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6
2.2 การเกิดโรคและการดำเนินของโรคหนองในในระดับโมเลกุล (Molecular pathogenesis). 10	
2.3 การวินิจฉัยตรวจสอบเชื้อ <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Diagnostics and Detection).....	13
2.4 การรักษาโรคหนองใน (Therapy of infection).....	15
2.5 การดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotics Resistance).....	16
2.6 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและระบบภูมิคุ้มกัน (Interaction of pathogen to Immune system).....	19
2.7 ปฏิสัมพันธ์ของแมคโครฟาจกับเชื้อ <i>N. gonorrhoeae</i> (Interaction of Macrophage cell to <i>N. gonorrhoeae</i>).....	20
2.8 Extracellular vesicles (EVs).....	26

2.9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบโปรตีโอมิกส์ (Proteomics Analysis)	34
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	36
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	36
3.2 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	38
3.3 วิธีการวิจัย	39
3.3.1 การนับปริมาณเซลล์	39
3.3.2 การตรวจสอบการติดเชื่อเซลล์แมคโครฟาจด้วยเทคนิค Fluorescence staining.....	40
3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ของ EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจ.....	42
3.3.4 การสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนจาก EVs	44
3.3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometry (LC MS/MS).....	46
3.3.6 การประมวลผลข้อมูลโปรตีโอมิกส์และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Proteomics data processing and quantification analysis).....	46
3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (Bioinformatics analysis).....	47
บทที่ 4 ผลการทดลอง	49
4.1 ผลการวิเคราะห์การติดเชื่อด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence staining analysis).....	49
4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein quantification)	51
4.3 ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ด้วยเทคนิค Tandem Mass spectrometry (LC MS/MS) และ การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล	52
4.3.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs markers)	52
4.3.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนของมนุษย์และเชื้อ <i>N. gonorrhoeae</i>	54
4.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry.....	55
4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนมนุษย์ (Human protein).....	58
4.5.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram	58

4.5.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ (Gene ontology : GO analysis).....	61
4.5.3 ผลการวิเคราะห์วิถี (Pathway analysis).....	75
4.5.4 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (Protein-protein interaction: PPI).....	76
4.6 ผลการวิเคราะห์หาตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein marker candidate analysis) ของโปรตีนมนุษย์.....	85
4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอมิกส์ของ <i>N. gonorrhoeae</i> protein.....	88
4.7.1 การวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram.....	88
4.7.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ (Gene ontology : GO analysis).....	90
4.8 การวิเคราะห์หาตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein marker candidate analysis) ของโปรตีน <i>N. gonorrhoeae</i>	99
4.8.1 โปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกัน (All-time course protein candidate).....	99
4.8.2 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา (Specific-time course protein candidate).....	102
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	106
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	106
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	113
5.3 ข้อเสนอแนะ	114
บรรณานุกรม.....	116
ภาคผนวก.....	132
ประวัติผู้เขียน.....	160

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณลักษณะการทดสอบการวินิจฉัยการติดเชื้อ <i>N. gonorrhoeae</i> ในห้องปฏิบัติการ.....	15
ตารางที่ 2 ชนิดและขนาดของ extracellular vesicles แต่ละชนิด.....	26
ตารางที่ 3 โปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs markers) ทั้งหมดจำนวน 27 ชนิด ที่แยกได้จาก EVs จากการศึกษาในครั้งนี้.....	53
ตารางที่ 4 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 0 <-> 1	85
ตารางที่ 5 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 1 <-> 6	86
ตารางที่ 6 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 6 <-> 12	87
ตารางที่ 7 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 12 <-> 24.....	88
ตารางที่ 8 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ของโปรตีนเชื้อที่แสดงออกที่เวลาร่วมกันทั้งสามช่วงเวลา	100
ตารางที่ 9 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6.....	102
ตารางที่ 10 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12.....	104
ตารางที่ 11 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24	104

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 รูปร่างของเชื้อ *N. gonorrhoeae* จาก urethral exudate ด้วยการย้อมสีแกรม..... 6

ภาพที่ 2 ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *N. gonorrhoeae* 7

ภาพที่ 3 อัตราการป่วยโรคหนองในในสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ.2008-2017..... 9

ภาพที่ 4 อัตราการป่วยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ.2008-2017 10

ภาพที่ 5 การพัฒนาการและกลไกการติดต่อของยาลูกปืนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* 18

ภาพที่ 6 การเพิ่มขึ้นของค่า MICs ของยาเซฟิซิมและเซฟไตรอะโซน ในปี ค.ศ. 2010..... 19

ภาพที่ 7 การปรับเปลี่ยนกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ของเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* 21

ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์ โครงสร้าง ส่วนประกอบ และการทำหน้าที่ของ exosomes 30

ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์เพาะเลี้ยง THP-1..... 39

ภาพที่ 10 ขั้นตอนในการตรวจสอบการติดเชื้อเซลล์แมคโครฟาจด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ 40

ภาพที่ 11 ขั้นตอนและกระบวนการในการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ของ EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจ..... 42

ภาพที่ 12 ส่วนประกอบในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค STAGE-Tips 46

ภาพที่ 13 ภาพจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Deconvolution microscope ของเซลล์แมคโครฟาจที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เวลา 1, 6, 12 และ 24..... 50

ภาพที่ 14 กราฟ Semi-logarithm แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* บริเวณ Extra- และ Intra-cellular ตั้งแต่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ... 51

ภาพที่ 15 กราฟการหาปริมาณโปรตีนด้วยการสร้างกราฟมาตรฐาน BSA..... 52

ภาพที่ 16 แผนภาพ Venn diagram ระหว่างโปรตีนที่ได้ในการศึกษากับโปรตีนจำเพาะของ EVs จากฐานข้อมูล Vesiclepedia 53

ภาพที่ 17 จำนวนโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกภายใน EVs ที่ช่วงเวลาต่างๆ..... 55

ภาพที่ 18 จำนวนโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) ภายใน EVs ที่ช่วงเวลาต่างๆ 56

ภาพที่ 19 แผนภาพ Heat map แสดงตัวอย่างการแสดงออกของโปรตีนของมนุษย์ที่ช่วงเวลาต่างๆ 57

ภาพที่ 20 แผนภาพ Venn-diagram แสดงจำนวนของโปรตีนมนุษย์ใน EVs ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลาต่างๆ 59

ภาพที่ 21 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนมนุษย์ที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ 60

ภาพที่ 22 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนมนุษย์ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ 60

ภาพที่ 23 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา จำแนกตามคุณสมบัติทั้ง 5 ประการ ในการวิเคราะห์ Gene ontology 62

ภาพที่ 24 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา 63

ภาพที่ 25 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) ยีนที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของออร์แกเนลล์และยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (protein-containing complex) โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา 64

ภาพที่ 26 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา 66

ภาพที่ 27 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในระดับเซลล์ (cellular process) และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic process) โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา 68

ภาพที่ 28 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา 70

ภาพที่ 29 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ catalytic activity โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา 71

ภาพที่ 30 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านกลุ่มโปรตีน (PC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา.....	73
ภาพที่ 31 วิธีที่เกี่ยวข้องของโปรตีนมนุษย์ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา.....	76
ภาพที่ 32 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนมนุษย์ (Protein-protein interaction) 77	
ภาพที่ 33 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 0 <-> 1	79
ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6	81
ภาพที่ 35 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12	82
ภาพที่ 36 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24.....	84
ภาพที่ 37 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนเชื้อ <i>N. gonorrhoeae</i> ทั้งหมดระหว่างช่วงเวลาต่างๆ.....	90
ภาพที่ 38 สัดส่วนของยีนของเชื้อทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา จำแนกตามคุณสมบัติทั้ง 5 ประการ ในการวิเคราะห์ Gene ontology	91
ภาพที่ 39 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา.....	93
ภาพที่ 40 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา.....	95
ภาพที่ 41 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา.....	96
ภาพที่ 42 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อที่แสดงคุณสมบัติด้านกลุ่มเอนไซม์ (EC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา.....	98
ภาพที่ 43 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อที่แสดงคุณสมบัติด้านวิถี (PW) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา.....	99

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

โกโนเรีย หรือโรคหนองใน เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยมีเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Neisseria gonorrhoeae* เป็นเชื้อก่อโรค อุบัติการณ์โรคหนองในพบมากเป็นอันดับต้นๆ ของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยมีอุบัติการณ์เป็นอันดับสองรองจากโรคหนองในเทียม (1) องค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ได้รายงานพบผู้ติดเชื้อใหม่ประมาณ 78-106 ล้านคนต่อปีทั่วโลก ในประเทศสหรัฐอเมริกา หน่วยงานป้องกันโรคติดต่อ (Centers for Disease Control; CDC) พบอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008-2017 โดยเฉพาะในกลุ่มช่วงอายุระหว่าง 17-24 ปี ซึ่งเป็นช่วงวัยเจริญพันธุ์ รวมถึงในประเทศไทย จากรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข สถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551-2560 โรคหนองในเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบมากที่สุด และยังคงมีอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ระหว่างปี พ.ศ. 2557-2560 การติดเชื้อหนองในนั้น ผู้ป่วยสามารถรับเชื้อแบคทีเรียผ่านทางระบบสืบพันธุ์ ปาก หรือทวารหนัก จากการมีเพศสัมพันธ์ที่ไม่มีการป้องกัน หรือในกรณีของผู้ป่วยหญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ทารกสามารถรับเชื้อระหว่างการคลอดได้ หลังจากเชื้อเข้าไปในร่างกายจะเกิดการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวและเกิดการยึดเกาะ (colonization) เป็นกลุ่มของเชื้อ ตามด้วยการบุกรุกเซลล์เยื่อผิวผ่านไปยังเนื้อเยื่อชั้นใน ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเชื้อจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันผ่านการจับกับตัวรับของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) เกิดการหลั่งสารกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ได้แก่ ไซโตไคน์ (cytokine) และเคโมไคน์ (chemokine) ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบและเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (neutrophil) จำนวนมากเคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีพยาธิสภาพ พบอาการหนองไหล ปวดแสบ (2) ปัญหาสำคัญของการติดเชื้อหนองในนั้น พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากไม่แสดงอาการของโรค ในผู้ชายมีราว 40 เปอร์เซ็นต์ (3) และในผู้หญิงมีอัตราสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (4) และพบว่าการติดเชื้อในกระแสโลหิตมักพบได้ในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ หากผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้อง การติดเชื้อจะพัฒนาอาการรุนแรงขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะเป็นหมันในผู้ชาย (male sterility) และภาวะอุ้งเชิงกรานอักเสบในผู้หญิง (pelvic inflammatory disease: PID) โดยภาวะดังกล่าวสามารถนำไปสู่การเป็นหมันถาวร อีกทั้งยังพบอัตราการติดเชื้อซ้ำสูง แม้จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อภายในร่างกายเกิดขึ้น (5, 6) ยังสามารถพบการติดเชื้อซ้ำอย่างมีนัยสำคัญและเป็นการติดเชื้อสายพันธุ์ (serovar) เดิม (7) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของแอนติบอดีชนิด IgG ในซีรัมของผู้ติดเชื้อซ้ำมีระดับไม่แตกต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก แสดงถึงระบบภูมิคุ้มกันจดจำไม่ได้รับการกระตุ้นจากการติดเชื้อ และไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ (8) ในปัจจุบันวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อหนองในกำลังค้นคว้าวิจัยและ

พัฒนา ถึงแม้ว่าสามารถวัดระดับของแอนติบอดีที่ถูกสร้างจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนในวัคซีนต้นแบบ (prototype) หลายรุ่น (9)

แม้ว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะทำงานตามปกติ แต่ยังมีพบว่าเชื้อมีการปรับตัวและหลบหลีกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้รบกวนระดับของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อลดต่ำลง และทำให้เชื้อไม่ถูกกำจัด มีชีวิตต่อภายในร่างกายได้ กระบวนการปรับตัวของเชื่อนั้นเกิดขึ้นผ่านหลายกลไก ดังนี้ กลไกแรกเป็นการป้องกันการดำเนินงานของระบบคอมพลีเมนต์ โดยสามารถป้องกันการดำเนินงานของระบบคอมพลีเมนต์ได้ทั้งในวิถีดั้งเดิม (classical pathway) และวิถีทางเลือก (alternative pathway) โดยการผลิตโปรตีนพอริน (porin protein) ที่จับกับโปรตีน C4 binding protein (C4BP) ในระบบคอมพลีเมนต์(10) และการผลิตโปรตีนแฟกเตอร์เฮช (factor H binding protein) เข้าจับกับแฟกเตอร์เฮชในมนุษย์ (human factor H) (11) ทำให้ยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ กลไกที่สองจะช่วยป้องกันการจับของแอนติบอดีโดยปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอนติเจนบนผิวเซลล์ของเชื้อ ได้แก่ O-Antigen บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โปรตีนทึบแสง (opacity protein: Opa) รวมถึงโปรตีนพิลิ (pili) (12) ให้มีความหลากหลายในการแสดงออกสูงเพื่อป้องกันการจับกับแอนติบอดี กลไกในการป้องกันของเชื้อจากระบบคอมพลีเมนต์และแอนติบอดีส่งผลให้เชื้อมีคุณสมบัติทนต่อซีรัม อีกทั้งจากข้อมูลทางคลินิกพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยไม่สามารถป้องกันและตอบสนองต่อการติดเชื้อซ้ำได้ (7) จากความสามารถในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอนติเจนดังกล่าวนี้ จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาวัคซีนสำหรับการติดเชื้อหนองใน ร่วมกับกลไกที่สามที่สนับสนุนการต่อต้านการทำลายของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกัน ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (macrophages) และนิวโทรฟิลล์ (neutrophil) โดยเซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) โดยเป็นเซลล์แรกที่ทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุกเข้ามาภายในร่างกาย และการนำเสนอแอนติเจนให้กับเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังทำหน้าที่ในการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) และเคโมไคน์ (chemokine) เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) กล่าวได้ว่าแมคโครฟาจเป็นเซลล์ตัวกลางในการทำหน้าที่ประสานการทำงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (13) กระบวนการฟาโกไซโทซิสของแมคโครฟาจเกิดขึ้นเมื่อเซลล์สัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ ผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ และเกิดการทำลายเชื้อภายในฟาโกโซมผ่านกระบวนการทำงานของไลโซโซม แต่กลับพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* นั้น กลับมีเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีชีวิตรอดและยังเพิ่มปริมาณในแมคโครฟาจได้ โดยการปรับเปลี่ยนกลไกการทำงานของแมคโครฟาจ ผ่านการกระตุ้นให้เซลล์มีการแสดงออกทางฟิโนไทป์ที่ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เรียกว่า tolerogenic phenotype เช่น กระตุ้นให้เซลล์หลั่งไซโตไคน์ในกลุ่มของ regulatory cytokine ชนิด interleukin-10 (IL-10) และ transforming growth factor beta 1 (TGF β -1) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญ เพิ่มจำนวน และวงจรชีวิตของเซลล์ ส่งผลให้กระบวนการนำเสนอแอนติเจน และการกระตุ้นการทำงานของ T-cell ลดลง รวมถึงยับยั้งการแสดงออกของ lymphocyte function-associated antigen 3 หรือ CD86 และ major histocompatibility complex (MHC) Class II ซึ่งเป็นโมเลกุลเสริม (co-stimulatory molecule)

ที่สำคัญต่อการนำเสนอแอนติเจน (14) ทั้งนี้ยังยับยั้งการพัฒนาถุงฟาโกโซมโดยโปรตีนพอลินบี (porin B; PorB) ซึ่งเป็นโปรตีนของเชื้อที่สามารถเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกันของถุงฟาโกโซมกับถุงไลโซโซม อีกทั้งยังลดการแพร่ของเอนไซม์คาเทปซินดี (cathepsin D) ภายในถุงไลโซโซมกับถุงฟาโกโซม กลไกดังกล่าวทำให้กระบวนการทำลายเชื้อภายในแมโครฟาจเสียไป (15) หากเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต้านจุลชีพของเซลล์แมโครฟาจซึ่งปกติจะมีกลไกที่จำกัดและลดปริมาณของธาตุเหล็กภายในเซลล์ (iron-limiting innate immune defense) เนื่องจากธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง *N. gonorrhoeae* มีความสามารถเพิ่มปริมาณของธาตุเหล็กภายในแมโครฟาจได้ ด้วยการกระตุ้นและยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในรักษาภาวะสมดุลของเหล็ก (iron homeostasis) (16) เชื้อ *N. gonorrhoeae* ยังสามารถยับยั้งการทำงานของกลไกออกซิเดทีฟเบิสต์ (oxidative burst) ของแมโครฟาจที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยโปรตีนพอลินบีที่สร้างจากเชื้อนี้สามารถยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ไมอีโลเปอร์ออกซิเดส (myeloperoxidase: MPO) จากอะซูโรฟิลิกแกรนูล (azurophilic granule) ของแมโครฟาจ ทำให้ยับยั้งขั้นตอนการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2) ไปเป็นกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid: HOCl) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของกลไก oxidative burst (17) เซลล์แมโครฟาจที่ติดเชื้อจะมีการปรับเปลี่ยนกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ที่เกิดขึ้นในสภาวะปกติเมื่อเซลล์เกิดการติดเชื้อ โดยเชื้อจะยับยั้งขั้นตอนการรวมกันของอโตฟาโกโซม (autophagosome) กับถุงไลโซโซมทำให้กระบวนการ autophagy ดำเนินไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อยึดอายุออกไปไม่ถูกทำลายตามกลไกปกติ (18)

ในขณะที่ยวกับการรักษาการติดเชื้อภายในเซลล์ด้วยยาปฏิชีวนะเป็นไปได้ยากและมีความท้าทาย เนื่องจากยาปฏิชีวนะต้องผ่านเยื่อหุ้มหลายชั้น ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว เยื่อหุ้มถุงฟาโกโซมและผนังเซลล์ของเชื้อ เมื่อยาปฏิชีวนะเข้าถึงตัวเชื้อระดับของยาต้องเพียงพอต่อการทำลายเชื้อภายในถุงฟาโกโซม (19) รวมถึงในขณะนี้สถานการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเป็นที่น่ากังวล พบว่าการพัฒนาของเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะเป็นไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ตั้งแต่เริ่มใช้และพบการดื้อต่อยา ยาปฏิชีวนะตัวแรกที่มีการใช้ได้แก่ ยาซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) ตามมาด้วยยาเพนิซิลลิน (penicillin) เตตราไซคลิน (tetracycline) และควิโนโลน (quinolones) ทั้งนี้มีรายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดอย่างต่อเนื่องตามลำดับ (20) ปัจจุบันเหลือยาปฏิชีวนะเพียงกลุ่มเดียวที่สามารถใช้ในการรักษาเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา คือ ยากลุ่มเซฟาโลสปอริน รุ่นที่ 3 (3rd generation cephalosporin) ได้แก่ เซฟไตรอะโซน (ceftriaxone) ที่แนะนำให้ร่วมกับยาอะซิโทรมายซิน (azithromycin) ทั้งนี้พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum of inhibitory concentrations; MICs) อย่างต่อเนื่องในหลายประเทศ (21) ในประเทศอังกฤษ ปี ค.ศ. 2018 มีรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อสายพันธุ์ดื้อต่อยาเซฟไตรอะโซนและยาอะซิโทรมายซินขนาดสูงที่ใช้รักษาร่วมกัน (22) ซึ่งจัดว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้พัฒนาไปสู่สายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกกลุ่มที่ใช้ในการรักษาหรือ superbug ทำให้สถานการณ์การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อหนองในสายพันธุ์ดื้อยาทุกชนิดมาถึงจุดวิกฤติ

เอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิล (extracellular vesicles: EVs) มีลักษณะเป็นถุงเวสิเคิลที่มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร โดยสามารถพบการหลั่ง EVs ได้ในเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด รวมถึงเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย EVs มีบทบาทสำคัญในการสื่อสารระหว่างเซลล์ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ และการก่อพยาธิสภาพในการติดเชื้อจุลชีพ ทั้งนี้ EVs สามารถจำแนกได้เป็น 5 ประเภท ได้แก่ 1. ไมโครพาทิเคิล (microparticles) 2. รีโทรไวรัสไลค์พาทิเคิล (retrovirus-like particles) 3. อะพอพโทติกบอดี (apoptotic bodies) 4. เอกโซโซม (exosomes) และ 5. แบคทีเรียลเอ็กตราเซลลูลาร์เวสิเคิล (bacterial extracellular vesicles) โดยเวสิเคิลแต่ละชนิดมีกระบวนการสร้าง ส่วนประกอบและบทบาทแตกต่างกัน (23, 24) จากการศึกษาการผลิต EVs ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* พบว่าเมื่อเซลล์เยื่อเมือปากมดลูกชนิดเพาะเลี้ยงติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะกระตุ้นการผลิตถุง exosome ที่บรรจุโปรตีน ICAP-2 ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะพอพโทซิส 2 (apoptosis-2) ในกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) ส่งผลให้เกิด apoptosis ของเซลล์เยื่อเมือช่องคลอด เชื้อที่อยู่ภายในเซลล์จึงสามารถมีชีวิตรอด เพิ่มจำนวน และหลบหลีกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ (25) ปัจจุบันการศึกษาการผลิต EVs จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อจุลชีพจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น โดยพบว่าถุง EVs ที่ผลิตออกมาจากเซลล์ที่มีการติดเชื้อมีบทบาทต่อการส่งสัญญาณหรือการตอบสนองของเชื้อกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) รวมถึงบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคไม่ว่าจะเป็นการศึกษาในเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* และ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (26-28) ภายในถุง EVs ที่ผลิตจากเซลล์ติดเชื้อจะบรรจุโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ (pathogen-associated molecular patterns: PAMP) และสารพิษจากเชื้อ (toxin) ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ เนื่องจาก EVs สามารถทนต่อเอนไซม์ต่างๆ ในกระแสโลหิตได้ เช่น เอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) รวมถึงระบบคอมพลีเมนต์ ทำให้ถุง EVs สามารถอยู่ในกระแสโลหิตได้เป็นระยะเวลาสั้นๆ จึงนำไปสู่การศึกษา EVs เพื่อติดตามการติดเชื้อและเป็นตัวแทนสารบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker candidates) ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อจุลชีพ เนื่องจากในระหว่างการติดเชื้อ ปริมาณและส่วนประกอบต่างๆ ของสารที่ถูกบรรจุภายในถุง EVs มีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาต่างๆ ตามระยะเวลาการติดเชื้อ (23) ถุง EVs จึงมีประโยชน์ในการพัฒนาสำหรับการใช้วินิจฉัยการติดเชื้ออย่างมาก เพื่อให้การวินิจฉัยมีประสิทธิภาพขึ้น โดยการศึกษาในคณะวิจัยของ P. K. Giri ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ของถุง EVs ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด J774 ที่ทำให้มีการติดเชื้อ Mtb สามารถจำแนกโปรตีนของเชื้อ Mtb ภายในถุง EVs ได้จำนวน 41 ชนิด (29) และในปี ค.ศ. 2014 ในการศึกษาในคณะวิจัยของ N. A. Kruh-Garcia ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ของถุง exosomes ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ Mtb ในระยะกำเริบ (active tuberculosis) และระยะแฝง (latent tuberculosis) ได้พบชุดของเปปไทด์ของเชื้อ Mtb ที่สามารถนำมาใช้เป็นสารบ่งชี้ชีวภาพในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อระยะกำเริบได้ (30)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของ EVs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนกับเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่มีการติดเชื้อ เพื่อหาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพ หรือ biomarkers เพื่อพัฒนาการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหนองใน โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ รวมถึงการตรวจคัดกรองผู้ที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* หรือ screening test

เพื่อลดอัตราการแพร่กระจายของเชื้อ รวมถึงเชื้อสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ การลดการพัฒนาไปสู่การเกิดการแทรกซ้อนที่รุนแรงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนใน extracellular vesicles (EVs) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นพัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจ ทั้งชนิดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

2. เพื่อวิเคราะห์หาตัวแทนโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพใน extracellular vesicles (EVs) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นพัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยทำการศึกษากำหนดการแสดงออกของโปรตีน extracellular vesicles (EVs) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง THP-1 เมื่อถูกกระตุ้นและพัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจทั้งชนิดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยการศึกษาโปรตีโอมิกส์ และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* เพื่อค้นหาตัวแทนของโปรตีนที่แสดงออกต่างกัน และมีคุณสมบัติใช้เป็นสารบ่งชี้ชีวภาพ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงการแสดงออกของโปรตีนใน extracellular vesicles (EVs) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง THP-1 หลังถูกกระตุ้นและพัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

2. ทราบถึงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่มีการติดเชื้อและไม่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

3. ค้นพบตัวแทนโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อหนองในโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแสดง

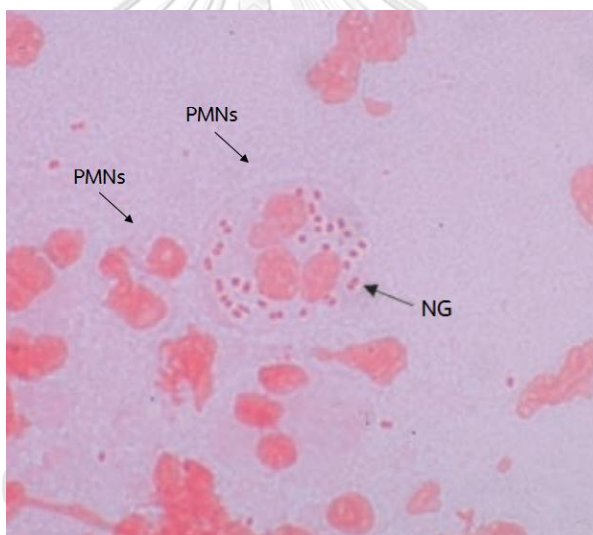
4. องค์ความรู้ใหม่ในการพัฒนาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae หรือโกโนค็อกไค (gonococci) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Neisseriaceae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) แกรมลบ รูปร่างกลมที่มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ หรือ diplococci สามารถบุกรุก และอาศัยอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ (intracellular bacteria) เมื่อทำการย้อมเชื้อด้วยสีย้อมสามารถมองเห็นรูปร่างคล้ายเม็ดเลือดขาวได้ กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 1 โดยตัวเชื้อมีขนาดประมาณ 0.6 ถึง 1.5 ไมครอน ไม่สามารถสร้างแคปซูลหรือสปอร์ และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (31)

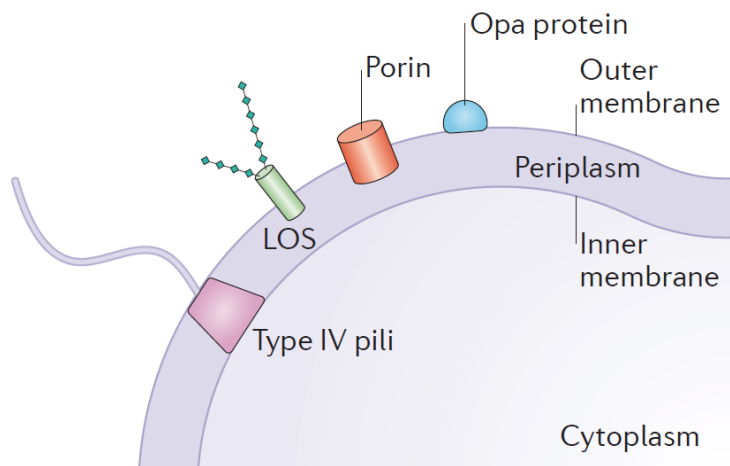


ภาพที่ 1 รูปร่างของเชื้อ *N. gonorrhoeae* จาก urethral exudate ด้วยการย้อมสีแกรม (NG: *N. gonorrhoeae*, PMNs: Polymorphonuclear cells (32)

2.1.1 ปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ของเชื้อ *N. gonorrhoeae*

สารประกอบชีวโมเลกุลบนผิวเซลล์จัดเป็นปัจจัยการก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยคุณสมบัติของแอนติเจนบนผิวเซลล์ (surface antigen) ทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งแอนติเจนเหล่านี้ยังมีการแสดงออกได้หลากหลายรูปแบบ รวมทั้งความสามารถเลียนแบบโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ในร่างกายได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรีย

มีความสามารถหลบหลีกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เชื้อจึงสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ได้ กลุ่มของแอนติเจนนี้ประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลดังภาพที่ 2 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 2 ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *N. gonorrhoeae* (2)

พิลหรือพิมเบรีย (pili or fimbriae) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์ภายในร่างกาย และช่วยป้องกันการเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวโดยประกอบไปด้วยโปรตีนพิลิน (pilin) เป็นโปรตีนหน่วยย่อย มีขนาดประมาณ 17-21 กิโลดัลตัน กรดอะมิโนบริเวณปลายสุดของโปรตีนพิลินจะถูกอนุรักษ์ (conserved region) ด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว ส่วนด้านปลายที่เป็นหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีนพิลินมีความหลากหลายสูง (variable region) ซึ่งพบลักษณะนี้ทั้งในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ พิลจึงเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการหลบหลีกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจากการจับของแอนติบอดีได้ (12)

โปรตีน por เป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ มีขนาดประมาณ 32-36 กิโลดัลตัน ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของสารอาหารบางประเภทของเชื้อ โปรตีน por มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยป้องกันการรวมกันของฟาโกโซมกับไลโซโซม และความต้านทานของเชื้อต่อซีรัม โดยจับกับคอมพลีเมนต์ชนิด C3b หรือ C4b เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากระบบคอมพลีเมนต์ในซีรัม รวมถึงยังมีบทบาทต่อการยืดระยะเวลาของการเกิดกระบวนการอะพอโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาว (12)

โปรตีน Opa มีขนาดประมาณ 20-28 กิโลดัลตัน เป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ทำหน้าที่จับกับตัวรับบนเซลล์ในร่างกาย เช่น heparin-related proteoglycan (HSPG) หรือ carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules (CEACAMs) การแสดงออกของโปรตีน Opa มีความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อเช่นเดียวกัน ซึ่งประกอบด้วยยีนจำนวน 11-12 ยีน (12)

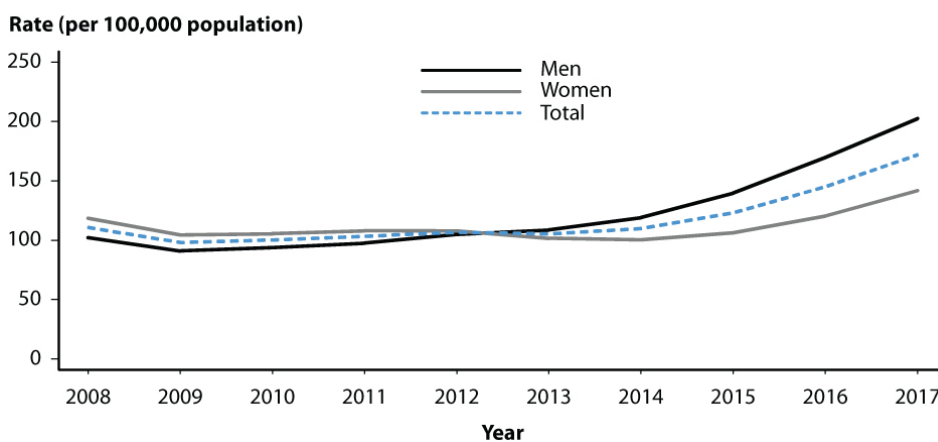
Lipooligosaccharide (LOS) ประกอบด้วยส่วนของ lipid A และ O-antigen โดย O-antigen ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่มีความยาวไม่มาก จึงเรียกว่า

lipooligosaccharide โดยมีขนาดประมาณ 3-7 กิโลดัลตัน และมีการแสดงออกได้หลายรูปแบบ LOS ทำหน้าที่เป็นเอนโดท็อกซิน (endotoxin) โดยมีความจำเพาะต่อเซลล์ในท่อนำไข่ของเพศหญิง ทำให้เกิดการสลายของซิเลีย (cilia) ภายในท่อนำไข่ ทำลายเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่ พบว่าโครงสร้าง LOS ของเชื้อกับไกลโคสฟิงโกไลปิด (glycosphingolipids) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มนุษย์ มีโครงสร้างเหมือนกัน ทำให้จับกับแอนติบอดีชนิดเดียวกันได้ อีกทั้ง LOS สามารถเกิดปฏิกิริยาการเติมกรดเซียลิก (sialic acid) ด้วยเอนไซม์เซียลิลทรานสเฟอเรส (sialyltransferase) ทำให้มีโครงสร้างชั้นนอกเหมือนกับเซลล์ของมนุษย์ที่ด้านปลายของไกลโคสฟิงโกไลปิดเป็นกรดเซียลิก จึงเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อสามารถหลบหนีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันการจับกับแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ได้ (12)

2.1.2 การระบาดของโรคหนองใน

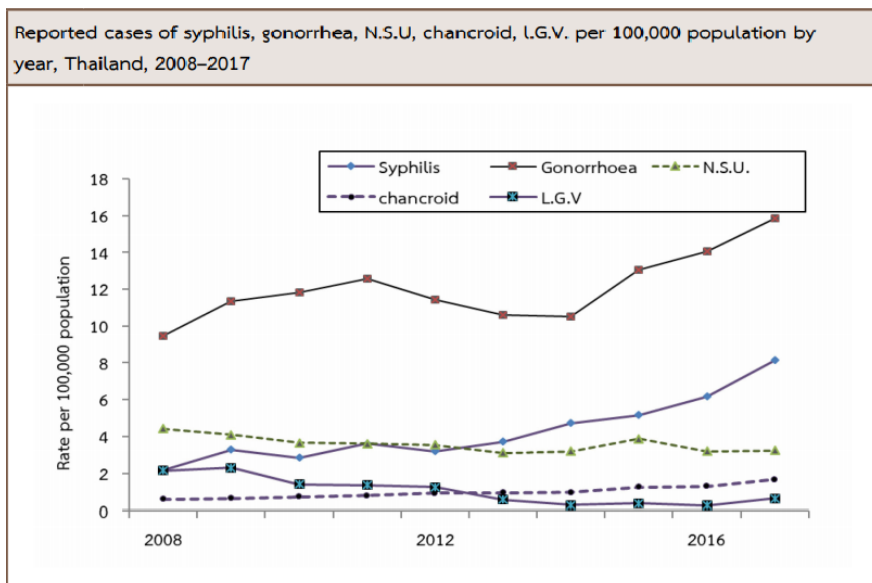
โรคหนองใน หรือโกโนเรีย (gonorrhoea) เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบบากเป็นอันดับสองรองจากโรคหนองในเทียม ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ในปี ค.ศ. 1999 พบว่ามีผู้ป่วยโรคหนองในสูงถึง 62 ล้านคนทั่วโลก (33) โดยในเขตเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอุบัติการณ์ผู้ติดเชื้อรายใหม่เกิดขึ้นสูงถึง 27.2 ล้านคน และในการศึกษาความชุกของโรคหนองใน ปี ค.ศ. 2008 ในคนอายุ 15 - 49 ปี พบว่ามีผู้ป่วยหนองในรายใหม่เพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ. 2005 ที่มีจำนวน 87.7 ล้านคนทั่วโลก เป็น 106.1 ล้านคนทั่วโลก คิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ (34) ซึ่งสอดคล้องกับสถานการณ์โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากรายงานของหน่วยงานป้องกันโรคติดต่อในสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control; CDC) ในปี ค.ศ. 2009 มีการรายงานอัตราผู้ป่วยโรคหนองในสูงสุดเป็นประวัติการณ์ 98.1 รายต่อประชากรหนึ่งแสนคน และมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องดังภาพที่ 3 อย่างไรก็ตามในช่วงปี ค.ศ. 2009-2012 มีอัตราการเป็นโรคเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในแต่ละปีเป็น 106.7 ราย ต่อประชากรหนึ่งแสนคน ในปี ค.ศ. 2013 อัตราการป่วยเป็นโรคลดลงเล็กน้อยมาอยู่ที่ 105.3 รายต่อประชากรหนึ่งแสนคน และในปี ค.ศ. 2014 มีผู้ป่วยรวมทั้งสิ้น 350,062 คน ที่ได้รับการรายงานและมีอัตราเพิ่มขึ้นถึง 110.7 รายต่อประชากรหนึ่งแสนคน โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุในช่วง 15-24 ปี โดยคิดเป็น 53 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยทั้งหมด (35)

Gonorrhoea — Rates of Reported Cases by Sex, United States, 2008–2017



ภาพที่ 3 อัตราการป่วยโรคหนองในในสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ.2008-2017 (36)

ในประเทศไทย พ.ศ. 2555 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขรายงานจำนวนผู้ป่วยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์จำนวน 2,972 ราย คิดเป็น 51.31 เปอร์เซ็นต์ต่อประชากรแสนคน โดยพบว่ามียอดอัตราผู้ป่วยเป็นโรคหนองในมากที่สุด ดังภาพที่ 4 มีจำนวน 7,312 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 11.38 เปอร์เซ็นต์ โดยพบผู้ป่วยเป็นโรคหนองในมากที่สุดในกลุ่มอายุ 15-24 ปี จำนวน 4,005 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 41.52 เปอร์เซ็นต์ต่อประชากรแสนคน รองลงมาคือกลุ่มอายุ 25-34 ปี จำนวน 1,455 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 14.34 เปอร์เซ็นต์ต่อประชากรแสนคน (37) และอัตราการเป็นโรคหนองในมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พบอัตราการเป็นโรคหนองในแต่ละปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 ถึง 2560 ต่อประชากรหนึ่งแสนคนเป็น 10.36, 10.50, 13.14, 14.72 และ 15.84 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยยังคงพบผู้ป่วยเป็นโรคหนองในมากที่สุดในช่วงอายุ 15-24 ปี (38)



ภาพที่ 4 อัตราการป่วยโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์จำแนกเป็น โรคซิฟิลิส (syphilis) โรคหนองใน (gonorrhoea) โรคหนองในเทียม (N.S.U. : non-specific urethritis) โรคแผลริมอ่อน (chancroid) และโรคฝีมะม่วง (L.G.V. : lymphogranuloma venereum) ในประเทศไทย ระหว่างปี ค.ศ.2008-2017 (39)

2.2 การเกิดโรคและการดำเนินของโรคหนองในในระดับโมเลกุล (Molecular pathogenesis)

การเกิดโรคและการดำเนินของโรคหนองในในเพศชาย เมื่อเกิดการเกาะกลุ่มกันของเชื้อที่บริเวณเซลล์เยื่อบุท่อปัสสาวะ โดยกระบวนการเกิดโรคมีลำดับดังนี้ เริ่มต้นจากการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวกับเชื้อผ่านการจับกันของ asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) ของเซลล์เยื่อบุผิวกับ LOS ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อโกโนเรีย ทำให้เกิดการก่อตัวบริเวณผิวเซลล์เยื่อบุผิว มีลักษณะเหมือนแท่นรองรับตัวเชื้อ เรียกการก่อตัวของโครงสร้างนี้ว่า pedestal formation การก่อตัวดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ถึงการบุกรุกของเชื้อ เนื่องจากเป็นการเริ่มต้นของกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) เมื่อเกิดการรวมของโปรตีนแอกติน (actin polymerization) จากนั้นเชื้อจะผ่านเข้าไปในแวคิวโอล (vacuole) และถูกปล่อยออกจากเซลล์เยื่อบุผิวไปยังชั้นคอลลาเจน (collagen) (40) การติดเชื้อภายในเซลล์เยื่อบุผิวพบว่า ASGP-R จะถูกนำกลับมาใช้ใหม่บนผิวเซลล์เยื่อบุผิว ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวความสามารถในการเกาะติดของเชื้อกับ ASGP-R ขึ้นกับการแสดงออกของน้ำตาลชนิด lacto-N-neotetraose (LNnT) บริเวณปลาย LOS ของเชื้อ (41) โดย LNnT มีส่วนประกอบคล้ายกับแอนติเจนในร่างกาย อีกทั้งยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับกรดเซียลิก (sialic receptor) ได้ จึงเป็นอีกหนึ่งกลไกที่ทำให้เชื้อสามารถหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (42) ทำให้เพิ่มสัดส่วนของเชื้อที่มีชีวิตรอดด้วยการเกิดกระบวนการเติมกรดเซียลิก (43)

การติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในเพศชายนำไปสู่การมีภาวะท่อปัสสาวะอักเสบเฉียบพลัน (acute urethritis) (44) โดยอาการจำเพาะของการติดเชื้อ คือ พบหนองไหลออกมาจากอวัยวะเพศจากการคั่งของเม็ดเลือดขาวและการหลุดลอกของเยื่อบุผิวผนังท่อปัสสาวะ (45) โดยพบว่าผู้ป่วยไม่แสดงอาการประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (3) จากการศึกษาพบว่า การติดเชื้อมีช่วงเวลาการฟักตัวของเชื้อตั้งแต่ได้รับเชื้อจนถึงแสดงอาการ (45) โดย 40 ชั่วโมงแรกของการติดเชื้อหรือเริ่มกระบวนการเกิดหนอง จะไม่สามารถทำการเพาะเชื้อได้จากท่อปัสสาวะ เนื่องด้วยเชื้อมีกระบวนการป้องกันตนเองจากระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอด และเพิ่มจำนวนได้ตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อในระยะแรกของโรค จากการศึกษาของอาสาสมัครเพศชายพบปริมาณของสาร interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) สูงในท่อปัสสาวะขณะที่มีการดำเนินไปของโรค (44) ผลการศึกษาปัจจุบันพบว่าโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อในส่วน LOS สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร IL-8, IL-6 และ TNF- α จากเซลล์เยื่อบุผิวท่อปัสสาวะ ทำให้เกิดการเริ่มต้นกระบวนการอักเสบและกระตุ้นให้เกิดการคั่งของเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการติดเชื้อ (46) ซึ่งเป็นเหตุให้มีการแสดงอาการของโรคตามที่พบ คือ อาการหนองไหล พยาธิสภาพจะยังคงเกิดขึ้นซ้ำไปมาและขยายต่อไปยังระบบสืบพันธุ์ส่วนบนได้หากไม่ได้รับการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งร่างกายยังต้องการการตอบสนองและการป้องกันของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อชะลอการดำเนินไปของโรคและการติดเชื้อซ้ำ โดยรายงานการศึกษาบ่งชี้ว่าการติดเชื้อยังคงอยู่เป็นเวลาหลายเดือนหากไม่ได้รับการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ (47)

การส่องกล้องจุลทรรศน์ในหนองของผู้ป่วยที่ถูกวินิจฉัยว่าติดเชื้อหนองใน จะพบเชื้อในเม็ดเลือดขาวชนิดหลายนิวเคลียส (polymorphonuclear cells: PMNs) และเซลล์เยื่อบุผิวที่เกิดจากผลของกระบวนการฟาโกไซโทซิสและการติดเชื้อลักษณะนี้จะเพิ่มความรุนแรงของอาการ Urethritis โดยปฏิสัมพันธ์ข้างต้นระหว่างเชื้อและเม็ดเลือดขาวชนิด PMNs ขึ้นกับการแสดงออกของโปรตีน Opa จากเชื้อโกโนเรีย (48, 49) เมื่อทดลองการติดเชื้อด้วยสายพันธุ์ที่มีโปรตีน Opa เป็นลบ (Opa-) ในเพศชาย พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อกลายเป็นสายพันธุ์ที่มีโปรตีน Opa เป็นบวก (Opa+) (45) และเชื้อสายพันธุ์ Opa+ เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในหนองของกลุ่มผู้ติดเชื้อ และเมื่อทดลองการติดเชื้อจากสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (mutant type) ของโปรตีน Opa พบว่าผลลัพธ์ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Opa มีบทบาทต่อการแสดงอาการท่อปัสสาวะอักเสบเมื่อมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและเม็ดเลือดขาวชนิด PMNs

สารประกอบ heparin-related proteoglycan (HSPG), carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules (CEACAMs) และ Integrin ทำหน้าที่เป็นตัวรับบนผิวเม็ดเลือดขาวชนิด PMNs ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกาะติดและผ่านเข้าเซลล์ของเชื้อ มีการตั้งข้อสังเกตว่าสารประกอบแต่ละชนิดบนผิวเซลล์ PMNs จะมีบทบาทต่อการเข้าจับกับเชื้อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น ในท่อปัสสาวะ หรือระบบไหลเวียนโลหิต CEACAMs จะสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับโปรตีนอื่นได้ เช่น Integrin หลังจากที่มีโมเลกุลทั้งสองเข้าจับกันจะเกิดการส่งสัญญาณปฐมภูมิ (primary signal) เข้าไปในเซลล์ ทำให้เกิดการกระตุ้นตัวรับในการเกาะติดของเชื้อโกโนเรียโดยที่ไม่มีสารนำที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบออกมา (50)

การเกิดโรคและการดำเนินของโรคหนองในในระบบสืบพันธุ์ส่วนล่างของเพศหญิง การตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยกระบวนการอักเสบภายในระบบสืบพันธุ์ส่วนล่างของเพศหญิงมีลักษณะตรงกันข้ามกับการติดเชื้อในท่อปัสสาวะของเพศชาย พบ 50-80 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่แสดงอาการ และ 70-90 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อโดยไม่แสดงอาการเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (51) ผลการวิเคราะห์สารคัดหลั่งจากช่องคลอดของเพศหญิงติดเชื้อไม่พบการสร้างแอนติบอดีต่อการติดเชื้อนี้ ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติเชื้อในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งในการศึกษาของ Hedges และคณะพบว่าในเพศหญิงที่มีการติดเชื้อบริเวณปากมดลูกไม่พบการผลิตสารน้ำ IL-1, IL-6 และ IL-8 (8) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูก น้ำเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกทั้งด้านในและด้านนอก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ (ตัวควบคุม) พบว่าให้ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ในระบบสืบพันธุ์ส่วนล่างของเพศหญิงมีการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่านวิถีทางเลือก (alternative pathway) เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในซีรัม เมื่อเกิดการติดเชื้อบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูก โปรตีน C3b จะเกาะติดกับ Lipid A บน LOS บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ (52) และจะถูกเปลี่ยน iC3b ซึ่งเป็นรูปที่ไม่สามารถทำงาน (inactive) ได้ (53) ปริมาณของ iC3b จะแปรผันตามจำนวน LOS ของเชื้อ ทำให้เชื้อไม่ถูกทำลายด้วยระบบคอมพลีเมนต์ ณ บริเวณปากมดลูก เนื่องจาก LOS ของเชื้อมีส่วนประกอบคล้ายพาราโกลโบไซด์ (paraglobosides) และโกลโคสฟิงโกไลปิด (glycosphingolipids) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างมูกบริเวณปากมดลูก (54)

ผลการวิเคราะห์ทั้งตัวอย่างจากชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ติดเชื้อและจากเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูก บ่งชี้ไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบว่าตัวรับคอมพลีเมนต์ 3 (complement receptor 3: CR3) ทำหน้าที่เป็นตัวรับปฐมภูมิเมื่อมีการเกาะติดและบุกรุกบริเวณด้านนอกและด้านในปากมดลูก (53) การเกาะติดของโปรตีนพิไลกับตำแหน่งโดเมน I ของ CR3 ส่งผลให้เชื้อสามารถเอาชนะแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างผิวเซลล์ของเชื้อกับเซลล์ปากมดลูก ทำให้เชื้อแนบติดอยู่กับผิวเซลล์ปากมดลูก ส่งผลให้มีการเข้าจับและทำลายด้วยการเกิดออปโซไนเซชัน (opsonization) ของโปรตีน C3b บนผิวของเชื้อโดยโปรตีน C3b ถูกเปลี่ยนเป็น iC3b ทั้งโปรตีน iC3b และโปรตีน Porin จากเชื้อจะเกาะติดที่ตำแหน่งโดเมน I ของ CR3 จึงเป็นการทำงานร่วมกันของโปรตีน iC3b โปรตีนพิไล และ Porin ของเชื้อ (55) ภายหลังจากการเกาะติดของเชื้อกับ CR3 จะทำให้เพิ่มโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนวินคิวลิน (vinculin) และโปรตีนเอสซีน (ezrin) มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อบุผิวปากมดลูกที่เรียกว่า รัฟเฟิลโฟเมชัน (ruffle formation) มีการพับย่นของเยื่อหุ้มเซลล์ (50) โดยเกิดจากการกระตุ้นของเอนไซม์ wortmannin-sensitive kinases ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ phosphatidylinositol 3-kinase หรือเอนไซม์ mitogen-activated protein kinases (56) และเอนไซม์ Rho GTPases (53) จากการทำงานร่วมกันของกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องนี้ทำให้เชื้อโกโนเรียถูกนำเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิว จากนั้นเชื้อจะปล่อยสาร phospholipase D homolog (NgPLD) ที่มีฤทธิ์เพิ่มการติดเชื้อของเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกผ่านหลายวิถี เช่น ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ CR3 ไปยังผิวเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูก (57) หรือส่งสัญญาณนำไปสู่การเกิด ruffle formation อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของ reactive oxygen species (ROS) และสารต้านจุลชีพ ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ภายในเซลล์ได้

กลไกที่กล่าวข้างต้นทำให้การติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ส่วนล่างของเพศหญิงมีภาวะเสมือนการเป็นพาหะนำโรค โดยการติดเชื้อไปยังมดลูกและท่อนำไข่อาจเกิดขึ้นได้โดยการหลุดลอกของเยื่อบุผิวจากการเปลี่ยนแปลงของฮอโมนหรือภาวะการมีประจำเดือน ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะอู้งเชิงกรานอักเสบ (pelvic inflammatory disease: PID) และการแพร่กระจายของเชื้อ (58) โดยพบระดับของโปรตีน C3 เพิ่มขึ้นสูงสุดในระหว่างการมีประจำเดือน ซึ่งบ่งชี้ว่าการติดเชื้อในระหว่างการมีประจำเดือนมีโอกาสเพิ่มการมีชีวิตรอดของเชื้อภายในร่างกาย (59) และพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกและไม่แสดงออกของโปรตีน Opa กับตำแหน่งที่พบเชื้อ โดยเชื้อชนิด Opa- จะพบเป็นส่วนมากในบริเวณท่อนำไข่และปากมดลูกในระหว่างการมีประจำเดือน ตรงข้ามกับเชื้อชนิด Opa+ พบมากบริเวณปากมดลูกช่วงเวลาที่มีการตกไข่ ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อมีบริเวณจำเพาะในการเกาะติดและก่อโรค อีกทั้งความสามารถของเชื้อในการใช้ฮีโมโกลบิน และ heptoglobin-hemoglobin ถูกสันนิษฐานว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อการพัฒนาเป็น PID และการแพร่กระจายในระหว่างการมีประจำเดือน (60) โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของตัวรับฮีโมโกลบินกับรอบของการมีประจำเดือน ซึ่งเชื้อต้องการใช้ฮีโมโกลบินในการดำรงชีวิต (61)

การเกิดโรคและการดำเนินของโรคหนองในในระบบสืบพันธุ์ส่วนบนของเพศหญิง จาก การติดเชื้อที่ปากมดลูกจะมีการพัฒนาสู่ภาวะ PID ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปัจจัยร่วมระหว่าง การแสดงออกของคอมพลีเมนต์จากการเปลี่ยนแปลงของฮอโมนในระหว่างการมีประจำเดือน และ โมเลกุลที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับที่สามารถจับกับเชื้อได้ (62) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อ บ่งชี้ว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CR3 ลดลงจากบริเวณส่วนนอกของปากมดลูกถึงท่อนำไข่ (53) ตรงข้ามกับการแสดงออกของโปรตีน lutropin receptor (LHr) หรือตัวรับฮอโมนลูทีไนซิง (lutinizing hormone: LH) ซึ่งพบทั้งในเพศชายและหญิง โดยทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการตกไข่ จะพบสูงขึ้นจากบริเวณผนังมดลูกถึงท่อนำไข่ในระหว่างที่มีประจำเดือน (62) สันนิษฐานว่า LHr ทำหน้าที่เป็นตัวรับและเพิ่มความสามารถในการบุกรุกเซลล์ของเชื้อสู่ผนังมดลูกและเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (63) นอกจากนี้ LHr ยังพบบนรกและเยื่อหุ้มตัวอ่อน (64) โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับ LHr สามารถทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนรุนแรง รวมถึงเพิ่มความเสี่ยงต่อการแท้งที่เกิดจากการติดเชื้อ ได้ การเกาะติดของเชื้อบริเวณท่อนำไข่ เกิดขึ้นที่บริเวณของเซลล์ผนังท่อนำไข่ที่ไม่มีซิเลีย (65) โดย peptidoglycan (66) และ LOS (67) ของเชื้อจะกระตุ้นให้มีการสร้างสาร TNF- α เพิ่มขึ้น โดยสาร TNF- α (68) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีซิเลีย ทำให้เกิดการหลุดลอกออกของเซลล์ ส่งผลให้ เชื้อสามารถเข้าถึงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ชั้นใน

2.3 การวินิจฉัยตรวจสอบเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* (Diagnostics and Detection)

การวินิจฉัยเชื้อในปัจจุบันสามารถทำได้หลายเทคนิค ได้แก่ การส่องกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ดังตารางที่ 1 การวินิจฉัยเบื้องต้นทำได้โดยตรวจสอบจากสิ่งส่งตรวจที่สเมียร์ (smear) ลงบนสไลด์แล้วนำไปย้อมสีแกรม หรือสี เมทิลีนบลู (methylene blue) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเชื้อจับตัวเป็นคู่ (intracellular

diplococci) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (PMNs) พบลักษณะเชื้อมีรูปร่างคล้ายเม็ดดั่วสองอันประกบกัน ภายในเซลล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ ให้ผลรวดเร็ว และมีความไวกับความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยผู้ป่วยชายที่มีอาการติดเชื้อหนองในบริเวณท่อทางเดินปัสสาวะ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่แนะนำให้ใช้เป็นวิธีเดียวสำหรับการวินิจฉัย โดยต้องมีการทำการทดสอบยืนยันอีกครั้ง ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อหรือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเฉพาะสิ่งส่งตรวจจากปากมดลูก (cervical) คอหอย (pharyngeal) และทวารหนัก (rectal) หรือสำหรับผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ เนื่องจากอาจเกิดผลลบล้อมได้ด้วยวิธีนี้มีความไวต่ำ (69)

การวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธี “Gold standard” มีความจำเพาะ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทำการตรวจสอบการดื้อยา (antimicrobial resistance testing: AMR) ได้ แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อมีความไวต่ำ ใช้เวลานาน และต้องใช้สภาวะค่อนข้างจำเพาะในการเก็บส่งตรวจ การขนส่งส่งตรวจ การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ หรือวิธีการในการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความไวต่อสภาพแวดล้อม ไม่ทนต่อความแห้งแล้ง และไวต่ออุณหภูมิต่ำ (31) การเก็บส่งตรวจ จึงต้องมีความระมัดระวังเป็นพิเศษมากกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ เพื่อรักษาสภาพของเชื้อให้สมบูรณ์ที่สุด การเก็บส่งตรวจด้วยสวอป (swab) ควรใช้เลือกใช้สวอปที่ปราศจากส่วนประกอบของแคลเซียมออกซิเจนและกรดไขมันซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อ ควรใช้เป็นชนิด dacron หรือ rayon swab สิ่งส่งตรวจสำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้แก่ ตัวอย่าง swab จากท่อปัสสาวะ (urethral) ปากมดลูก (cervical) มดลูก (vaginal) ช่องปากคอหอย (oropharyngeal) ทวารหนัก (rectal) และเยื่อบุตา (conjunctiva) ตัวอย่างจากปัสสาวะ (urine) และตัวอย่างสารน้ำจากร่างกาย (body fluid) (69) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่ปราศจากกรดไขมัน ซึ่งพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อนชนิดอื่นๆ เช่น thayer-martin agar (MTM) หรือ martin-lewis agar (ML) ที่ผสมยาปฏิชีวนะต่างๆ เช่น แวนโคมัยซิน (vancomycin) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โคลิสติน (colistin) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงเชื้อประจำถิ่น (normal flora) และเชื้อ *Neisseria* ประจำถิ่น (commensal *Neisseria*) ไตรเมโทพริม (trimethoprim) เพื่อยับยั้งเคลื่อนที่ของเชื้อ *Proteus spp.* และไนสแตติน (nystatin) หรือแอมโฟเทราซินบี (amphotericin B) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้ต้องปรับให้เป็นสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโต หลังจากบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จะพบโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ถึง 4 มิลลิเมตร ให้ผลทดสอบชีวเคมีทั้งการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) การสร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase test) การสร้างเอนไซม์ซูเปอร์ออกซอล (superoxol test) และการใช้น้ำตาลกลูโคส (cysteine trypticase agar: CTA-glucose) ให้ผลบวก (69)

การวินิจฉัยด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ (nucleic acid amplification: NAAT) เป็นวิธีที่มีความไวที่สุด โดยเฉพาะการวินิจฉัยเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากคอหอยและทวารหนัก และมีประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยเชื้อหนองใน เนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อได้แม้เชื้อจะไม่มีชีวิต อีกทั้งต้องการปริมาณสิ่งส่งตรวจน้อยและสามารถใช้ตัวอย่างปัสสาวะในการตรวจได้ซึ่งเป็นการเก็บส่งตรวจที่สะดวกและปลอดภัยต่อผู้ป่วย อย่างไรก็ตามวิธี NAAT มีข้อเสียที่สำคัญ คือ ไม่สามารถ

ตรวจสอบการดื้อยาของเชื้อได้และพบว่าสิ่งส่งตรวจมักมีการปนเปื้อน commensal *Neisseria* ที่มีสารพันธุกรรมบางส่วนเหมือนกับ *N. gonorrhoeae* ทำให้เกิดการข้ามปฏิกิริยา (cross reaction) ให้ผลทดสอบลวงหรือผลบวกปลอมได้ อีกทั้งการวินิจฉัยด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยังไม่ได้รับการรับรองเพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อที่บริเวณอื่นนอกเหนือจากระบบสืบพันธุ์และการติดเชื้อในเด็ก (70-73)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของการทดสอบการวินิจฉัยการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในห้องปฏิบัติการ (NAHT: nucleic acid hybridization test, NAAT: nucleic acid amplification test, EIA: enzyme immunosorbent assay, RDT: rapid diagnostic test, ND: not determined) (74)

Test	Sensitivity	Specificity	Complexity		Time	Relative cost
			Expertise	Equipment		
Bacterial culture	60-70%	99-100%	+++	+++	48 hours	++
Microscopy	Men: 84-95 % Women: 50%	≥95%	++	+	1 hours	+
NAHT	85-90%	95-99%	+++	+++	4 hours	+++
NAAT	90-95%	98-100%	++++	++++	4 hours (longer to confirm)	++++
Antigen detection						
EIA	50-70%	95-99%	++	++	4 hours	++
RDT	ND	ND	+	None	30 minutes	ND

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 การรักษาโรคหนองใน (Therapy of infection)

แนวทางการรักษาโรคหนองในโดยหน่วยงานป้องกันโรคติดต่อในสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control; CDC) แนะนำให้ใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟฟาโรสปอริน รุ่นที่ 3 (3rd generation cephalosporin) ได้แก่ เซฟิซิม (cefixime) สำหรับรับประทาน และเซฟไตรอะโซน (ceftriaxone) สำหรับฉีด การรักษาโดยการใช้ยาแบ่งออกเป็นแบบใช้ยาชนิดเดียว คือ ยาเซฟไตรอะโซนฉีดให้กับผู้ป่วยและการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันสองชนิดโดยใช้ยาเซฟไตรอะโซนร่วมกับอะซิโทรมัยซิน (azithromycin) ฉีดให้กับผู้ป่วย (75)

การติดเชื้อภายในเซลล์กับการรักษา (Intracellular infection to therapy) เชื้อ *N. gonorrhoeae* มีความสามารถในการบุกรุกและมีชีวิตอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณและยืดระยะเวลาการเกิดกระบวนการอะพอโทซิสของเซลล์ให้นานขึ้น ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเพื่อกำจัดเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์เป็นเรื่องที่ทำหาย โดยต้องรักษาระดับยาให้คงที่และมีปริมาณมากพอในการกำจัดเชื้อ ในกระบวนการขนส่งยาไปยังเป้าหมายต้องผ่านชั้นเยื่อหุ้มเป็นลำดับถึง 3 ชั้น ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์เจ้าบ้าน เยื่อหุ้มฟาโกโซม และผนังเซลล์ของเชื้อ โดยเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านมีโครงสร้างเป็นชั้นไขมันสองชั้น (lipid bilayers) ทำให้ยาปฏิชีวนะต้องเป็นชนิดไม่มีขั้วจึงสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (19) เช่น กลุ่มเบต้า-แลคแทม (β -lactam) แมโครไลด์ (macrolide) และควิโนโลน (quinolones) แต่ด้วยข้อจำกัดของยากลุ่มเบต้า-แลคแทมที่ไม่ออกฤทธิ์เมื่ออยู่ภายในเซลล์ยูคาริโอต (76) ทั้งกลุ่มแมโครไลด์และกลุ่มควิโนโลนที่มีข้อจำกัดเรื่องการรักษาระดับยาภายในเซลล์ต่ำ (19, 77) ทำให้ถูกขับออกจากเซลล์เจ้าบ้านได้ โดยผ่านทาง P-glycoprotein efflux pumps อีกทั้งการคงอยู่ของยาภายในเอนโดโซม (endosome) จะลดลงเมื่อถูกขนส่งออกนอกเซลล์โดยกระบวนการ exocytosis ได้ (78) ทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษาต่ำ ในขณะที่ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) ที่สามารถขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis โดยอาศัยจับกับตัวรับมีกาลิน (megalin) ที่อยู่บริเวณท่อไต ทำให้เกิดการสะสมของยาและเกิดภาวะเป็นพิษต่อไตของผู้ป่วยได้ (79)

2.5 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotics Resistance)

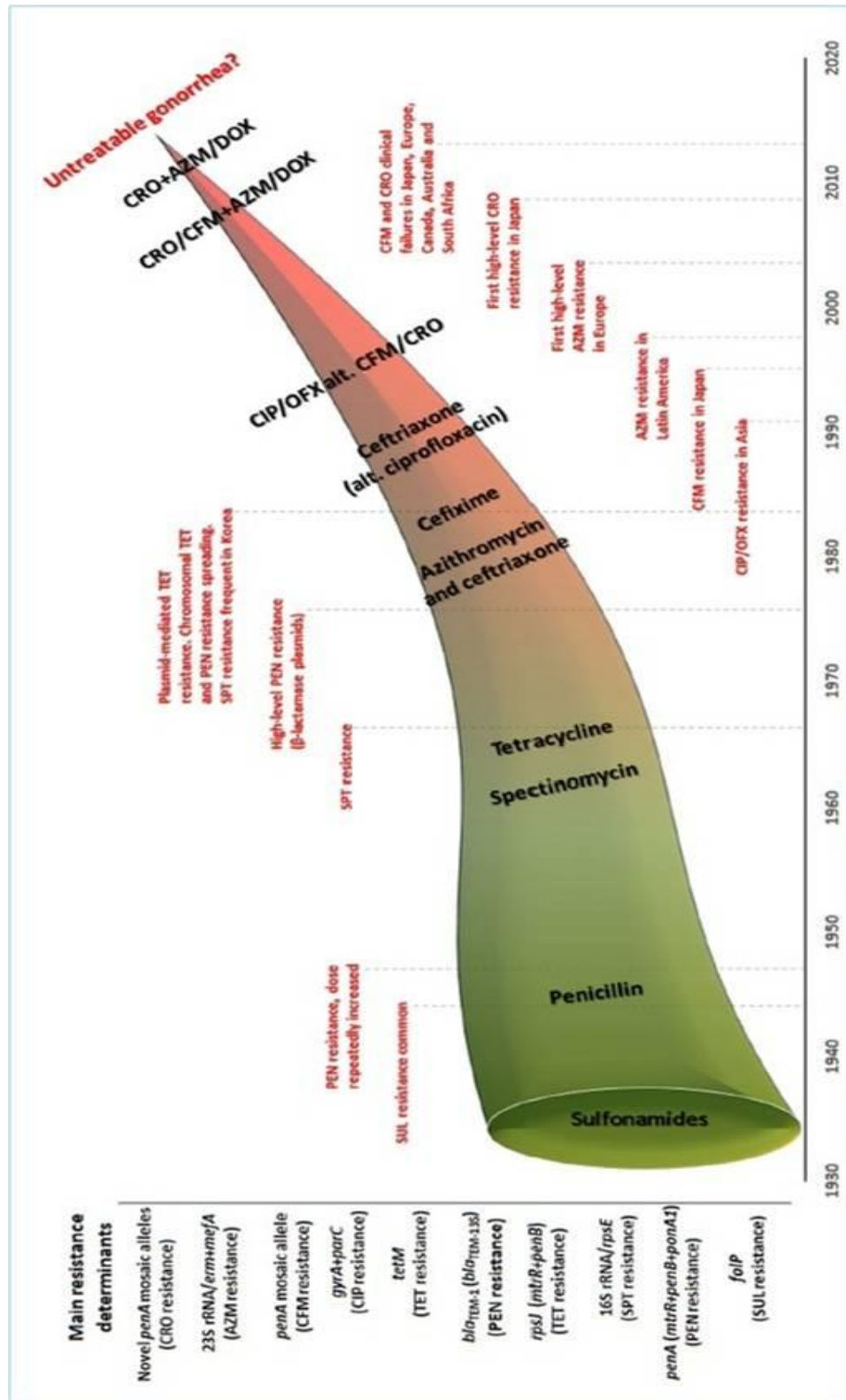
สถานการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะสามารถแสดงพัฒนาการการดื้อยาได้ดังภาพที่ 5 รายงานโดยองค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2009 พบการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลน (quinolone) แลกแบบซิฟิกตะวันตกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถแยกเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 9,744 สายพันธุ์ เชื้อที่พบมีความไวต่อยากลุ่มควิโนโลนลดลง จำนวน 360 สายพันธุ์ คิดเป็น 3.7 เปอร์เซ็นต์ และดื้อต่อยากลุ่มควิโนโลน จำนวน 5,404 สายพันธุ์ คิดเป็น 55.5 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะประเทศไทยแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยจำนวน 540 สายพันธุ์ พบเชื้อมีความไวต่อยากลุ่มควิโนโลนลดลง จำนวน 111 สายพันธุ์ คิดเป็น 20.6 เปอร์เซ็นต์ และดื้อต่อยากลุ่มควิโนโลน จำนวน 416 สายพันธุ์ คิดเป็น 77.0 เปอร์เซ็นต์ (80) และบางส่วนมีค่า MICs ของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟฟาโรสปอรินเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีค่าเพิ่มขึ้นเหมือนกัน โดยเฉพาะประเทศอินเดียเพียงประเทศเดียวพบถึง 10.8 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย (21)

ในปี ค.ศ. 2010 การดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลิน ในแถบแปซิฟิกตะวันตกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 9,702 สายพันธุ์ มีความไวต่อยากลุ่มเพนิซิลินลดลง 2,229 สายพันธุ์ คิดเป็น 23.0 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลิน จำนวน 1,300 สายพันธุ์ คิดเป็น 13.4 เปอร์เซ็นต์ และในประเทศไทยพบเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 611 สายพันธุ์ มีความไวต่อยากลุ่มเพนิซิลินลดลงมากถึง 503 สายพันธุ์ คิดเป็น 82.3 เปอร์เซ็นต์ และดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลินจำนวน 88 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.4 เปอร์เซ็นต์ (80) ในขณะที่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลนบริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จากผู้ป่วยจำนวน 828 สายพันธุ์ พบเชื้อดื้อยาสูงถึง 768

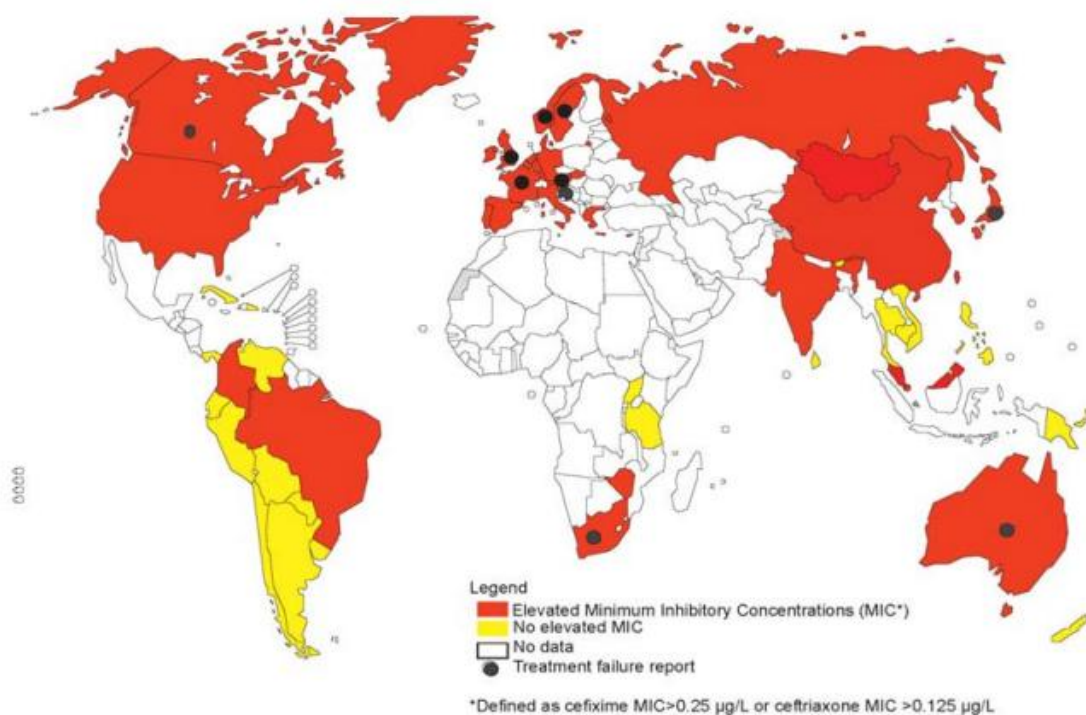
สายพันธุ์ คิดเป็น 92.75 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะประเทศไทยจากผู้ป่วยจำนวน 540 สายพันธุ์ พบเชื้อดื้อยามากถึง 527 สายพันธุ์ คิดเป็น 97.6 เปอร์เซ็นต์ ยังพบค่า MICs ของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟทาโรสปอรินเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบค่า MICs สูงขึ้นจำนวน 149 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.5 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวน 1,027 สายพันธุ์ ในประเทศไทยพบจำนวน 143 สายพันธุ์ คิดเป็น 19.9 เปอร์เซ็นต์ จากผู้ป่วยจำนวน 720 สายพันธุ์ (21) และในปี 2012 จากการติดตามเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟทาโรสปอริน รุ่นที่ 3 ที่ใช้ในการรักษา บริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากผู้ป่วยจำนวน 1,878 สายพันธุ์ พบเชื้อดื้อยา จำนวน 18 สายพันธุ์ คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ และยังไม่พบมีการดื้อยากลุ่มนี้ในประเทศไทย แต่มีข้อสังเกตถึงค่า MICs ที่เพิ่มขึ้นจำนวน 213 สายพันธุ์ (81)

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970-1979 ที่เริ่มพบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนิซิลินและเตตระไซคลิน และพัฒนาการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในช่วงทศวรรษที่ 1980 ต่อมาในช่วงต้นปี ค.ศ. 1990 ทำให้ทั่วโลกเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่เชื้อดื้อยา แต่ยังคงพบการดื้อยากลุ่มควิโนโลนในระดับสูง เมื่อเข้าสู่กลางปี ค.ศ. 2000 พบการแพร่กระจายไปในหลายประเทศจึงนำไปสู่การปรับปรุงแนวทางการใช้ยากลุ่มเซฟทาโรสปอรินรุ่นที่ 3 ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มสุดท้ายที่สามารถใช้รักษาเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาได้ อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มขึ้นของค่า MICs ของยากลุ่มดังกล่าวในหลายพื้นที่ทั่วโลก ดังภาพที่ 6 โดยในปี ค.ศ. 2007 ได้มีรายงานพบเชื้อดื้อยาเซฟิซิม ในประเทศญี่ปุ่น และรายงานความล้มเหลวในการรักษาด้วยยาเซฟิซิมในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย แคนาดา ฝรั่งเศส นอร์เวย์ แอฟริกาใต้ และสหราชอาณาจักร ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว แต่อุบัติการณ์โรคหนองในกลับพบมากในประเทศที่ขาดแคลนทรัพยากร เนื่องจากประเทศเหล่านั้นมีข้อจำกัดของทรัพยากรในการเฝ้าระวัง ติดตาม และการรักษาโรค (20, 81)

ในปี ค.ศ. 2018 ประเทศอังกฤษ ได้รายงานเป็นกรณีแรกที่พบผู้ป่วยติดเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเซฟิโตรอะโซนและอะซิโทรมัยซินขนาดสูงที่ให้ร่วมกันในการรักษา (22) เชื้อได้พัฒนาตัวเองไปสู่เชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวที่สามารถใช้ในการรักษา (superbug) นั้นหมายความว่า การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคหนองในได้มาถึงจุดวิกฤติ



ภาพที่ 5 การพัฒนาการและกลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยจำแนกตามชนิดยาปฏิชีวนะ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1930-2020 (20)



ภาพที่ 6 การเพิ่มขึ้นของค่า MICs ของยาเซฟิซิมและเซฟไตรอะซอน ในปี ค.ศ. 2010 (21)

2.6 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและระบบภูมิคุ้มกัน (Interaction of pathogen to Immune system)

ปฏิสัมพันธ์กับระบบคอมพลีเมนต์ในซีรัม (Interaction to complement system)

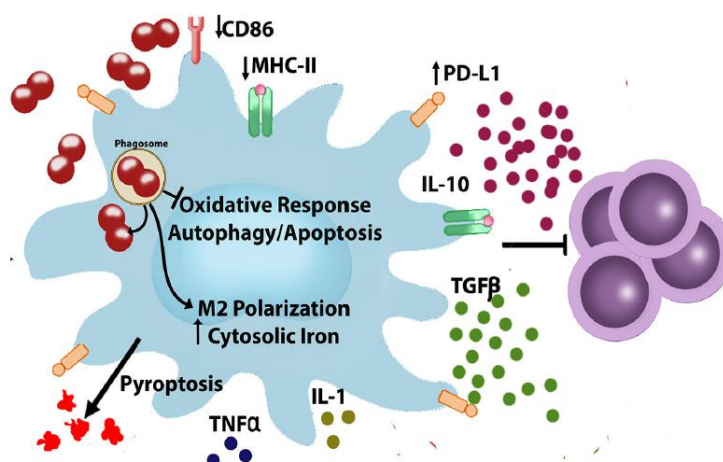
เชื้อโคโนเรียที่จับกับคอมพลีเมนต์ในซีรัมจะเกิดปฏิสัมพันธ์ผ่านวิถีดั้งเดิม (classical pathway) เป็นส่วนใหญ่แตกต่างจากบริเวณเยื่อบุปากมดลูกที่มักเกิดปฏิสัมพันธ์ผ่านวิถีทางเลือก (alternative pathway) พบว่าเชื้อที่มีโปรตีนพอลิน (porin) ชนิด PI.A จะส่งเสริมให้เกิดการแพร่กระจาย (82) เชื้อจะใช้โปรตีนชนิด PI.A ในการยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ โดย alternative pathway โปรตีน PI.A จะเข้าจับกับ Factor H ในระบบคอมพลีเมนต์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ ในขณะที่กระบวนการ classical pathway โปรตีน PI.A จะเข้าจับกับ C4-binding protein (C4bp) ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อทนต่อซีรัมมากขึ้น อีกกลไกการทำงานที่สำคัญของระบบคอมพลีเมนต์คือการทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกออก ด้วยการประกอบเป็นโครงสร้าง membrane attack complex (MAC) บนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โครงสร้าง MAC ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการดำเนินของโรค การเกาะติด และเพิ่มจำนวน (colonization) รวมถึงการแพร่กระจายของเชื้อ จากการศึกษาของ Joiner และคณะพบความสัมพันธ์ระหว่างการทนต่อซีรัมของเชื้อและการประกอบโครงสร้าง MAC โดยในเชื้อที่ทนต่อซีรัมจะพบการประกอบโครงสร้าง MAC ที่ผิดปกติ (83, 84) อีกทั้งหากผู้ป่วยมีความบกพร่องของคอมพลีเมนต์ เช่น C5, C6, C7, C8 และ C9 จะทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคซ้ำและการติดเชื้อในระบบไหลเวียนโลหิต (51)

ปฏิสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (Interaction to Innate Immune system)
 เชื้อแบคทีเรียจะถูกตรวจจับด้วยเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่อยู่บริเวณเยื่อบุผิว ได้แก่ แมคโครฟาจ (macrophage) เซลล์ทีเฮลเปอร์ (T-helper cells) และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) รวมถึงการตรวจจับโดยเซลล์เยื่อบุผิวเอง โดยเซลล์เหล่านี้สามารถรับรู้การติดเชื้อผ่านตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อจับกับ LOS หรือ peptidoglycan ของเชื้อ ได้แก่ Toll-like receptor (TLR) และ cytoplasmic NOD-like receptor (NLR) (85-87) การติดเชื้อจะกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด pro-inflammatory และคีโมไคน์ ได้แก่ IL-6, IL-8, IL-1B, IL-17 และ Interferon-gamma (IFN- γ) รวมถึงไซโตไคน์ที่ควบคุมการแสดงออกของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ทำให้เกิดการกระตุ้นและการรวมกลุ่มกันของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ ก่อให้เกิดการอักเสบบริเวณเยื่อบุผิวที่มีการติดเชื้อ (11) และหากเกิดการติดเชื้อในเซลล์แมคโครฟาจ เชื้อจะปรับเปลี่ยนกระบวนการอะพอพโทซิสและการผลิตไซโตไคน์ของเซลล์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในเซลล์นานขึ้น (88) รวมทั้งยังเปลี่ยนแปลงการทำงานของแมคโครฟาจโดยการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ได้ (89) เมื่อเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดต่อการกระตุ้นจากเชื้อ จะทำให้มีการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์จำนวนที่เพียงพอต่อการแสดงอาการ จึงพบว่าผู้ป่วยจำนวนหนึ่งจะมีหนองไหลจากอวัยวะเพศ แต่ผู้ป่วยจำนวนมากที่ไม่แสดงอาการของโรค อาจเนื่องมาจากการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์มีจำนวนไม่เพียงพอต่อการแสดงอาการหรืออาจไม่มีการกระตุ้นการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์เกิดขึ้นในการติดเชื้อครั้งนั้น (2)

2.7 ปฏิสัมพันธ์ของแมคโครฟาจกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* (Interaction of Macrophage cell to *N. gonorrhoeae*)

หลังจากเชื้อโกโนเรียบุกรุกเข้ามาในร่างกาย เชื้อจะเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผิวและบุกรุกเคลื่อนที่ผ่านมายังเนื้อเยื่อชั้นใน ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (Innate immune system) เป็นระบบภูมิคุ้มกันด่านแรกที่ตอบสนอง โดยเซลล์ชนิดแรกที่ทำหน้าที่นั้น ได้แก่ เซลล์แมคโครฟาจ ที่พัฒนามาจากเซลล์โมโนไซต์ซึ่งไหลเวียนในกระแสโลหิตแล้วเกิดการเคลื่อนที่มายู่บริเวณเนื้อเยื่อของร่างกาย เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในระบบ innate immune system ทำให้ร่างกายรู้ว่าเกิดการบุกรุกของเชื้อเข้ามาในร่างกายโดยตรวจจับสารชีวโมเลกุลของเชื้อจุลชีพที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) หรือ danger-associated molecular patterns (DAMPs) กับตัวรับบนผิวเซลล์แมคโครฟาจชนิด genome-encoded pattern recognition receptors (PRRs) (90) ยังทำหน้าที่สำคัญในการส่งต่อสัญญาณกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune system โดยการนำเสนอแอนติเจนให้กับเซลล์ที่ตอบสนองอย่างจำเพาะ กระตุ้นให้มีการแบ่งตัว การสร้างแอนติบอดี และการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ สนับสนุนการทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อจุลชีพ เมื่อแมคโครฟาจเกิดการสัมผัสกับเชื้อจุลชีพผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสผ่านทาง non-opsonization ซึ่งอาศัยการจับของโปรตีน Opa และ pili ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อกับตัวรับบนผิวเซลล์แมคโครฟาจ (91) ด้วยการแสดงออกของโปรตีน Opa และ pili นั้นมีความหลากหลายสูง โดยโปรตีน Opa สามารถแสดงออกได้

ถึง 11 ฟิโนไทป์ (Opa₅₀ - Opa₆₀) และแต่ละฟิโนไทป์แสดงออกเป็นอิสระต่อกัน จากการศึกษาของ B. Knepper และคณะ ถึงความหลากหลายในการแสดงออกของโปรตีน Opa และ pili ต่อการตอบสนองของเซลล์แมโครฟาจ พบว่าการแสดงออกที่ต่างกันของโปรตีน Opa และ pili มีผลต่ออัตราการเกิดฟาโกไซโทซิสของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่างกัน และยังรวมถึงการทำงานของกระบวนการ oxidative burst ที่ให้ผลแตกต่างกัน ดังนั้นชนิดของโปรตีน Opa และ pili จึงมีผลต่อการทำงานของแมโครฟาจทั้งในกระบวนการฟาโกไซโทซิส และ oxidative burst กระบวนการมีชีวิตรอดของเชื้อภายในเซลล์แมโครฟาจเกิดขึ้นหลายกระบวนการ ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การปรับเปลี่ยนกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ของเซลล์แมโครฟาจที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การปรับเปลี่ยนการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน การยับยั้งกระบวนการ oxidative response การกระตุ้นการแสดงออกของฟิโนไทป์ของเซลล์แมโครฟาจ การปรับเปลี่ยนกระบวนการใช้เหล็ก และการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ (92)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.7.1 กระบวนการมีชีวิตรอดของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในแมโครฟาจ (Survival Process inside of Macrophage)

เมื่อแมโครฟาจเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสเชื้อ *N. gonorrhoeae* จะเกิดปฏิสัมพันธ์ผ่านกลไกต่างๆ ภายในเซลล์แมโครฟาจ ทั้งต่อต้านหรือยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่รอด และเพิ่มปริมาณภายในเซลล์แมโครฟาจได้ กลไกดังกล่าวนี้ ได้แก่

1. การปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยผลการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* พบการกระตุ้นการสร้างฟิโนไทป์ชนิด tolerogenic ของแมโครฟาจ ซึ่งฟิโนไทป์นี้ส่งผลให้เชื้อสามารถทนต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ด้วยการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokine) ได้แก่ IL-10 และ transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)

เพื่อยับยั้งการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ไซโตไคม์ทั้งสองเป็นกลุ่มของไซโตไคม์ควบคุม (regulatory cytokine) โดย IL-10 ทำหน้าที่ในการยับยั้งการสร้าง IL-12 ซึ่งเป็น inflammatory cytokine มีบทบาทต่อการพัฒนาของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด Type 1 T-Helper cell (TH1) ซึ่งสำคัญต่อการทำลายเชื้อที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวและกระตุ้นการทำงานของ Cytotoxic T lymphocytes (CTL-mediated cytotoxicity) ของเซลล์ Natural killer (NK-cell) และ T-cell รวมถึง IL-10 ยังยับยั้งการสร้าง co-stimulators และ major histocompatibility complex (MHC) Class II ที่มีบทบาทสำคัญต่อการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและยังทำหน้าที่เป็นไซโตไคม์สำคัญในการพัฒนา Type 1 T regulatory cells (Tr1) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ T-cell ชนิดอื่น (93) ในส่วนของไซโตไคม์ชนิด TGF- β 1 มีผลต่อการทำงานของเซลล์หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิด T cell ที่ยับยั้งการแบ่งตัวและการทำงาน ชนิด B cell จะยับยั้งการแบ่งตัวและการสร้างแอนติบอดีชนิด IgA รวมทั้งยับยั้งการกระตุ้นแมโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นจากกลุ่มของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด (angiogenic factors) (13) ในการศึกษาที่ไม่พบระดับของไซโตไคม์ชนิด TNF- α เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไซโตไคม์ที่กระตุ้นการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) และพบว่าเซลล์แมโครฟาจที่ติดเชื้อมีการกระตุ้นการทำงานร่วมกันของโปรตีน CD86 และ MHC class II ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญต่อการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells) ส่งผลให้การทำงานของเซลล์แมโครฟาจในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system) ด้วยการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ T-cell ชนิด CD4 ผ่านการนำเสนอแอนติเจนสูญเสียไป ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในภาวะที่มีการติดเชื้อ (14) สอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์แมโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นและเปลี่ยนแปลงจากเซลล์โมโนไซต์ที่แยกจากมนุษย์ ผลศึกษากระบวนการโพลาไรเซชัน (polarization) ของเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์แมโครฟาจรับสัญญาณจากสภาพแวดล้อมโดยรอบเซลล์ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ (microenvironment) และปรับเปลี่ยนหน้าที่เพื่อตอบสนอง เช่น microenvironment ที่มี T-cell เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อจุลินทรีย์ ขบวนการโพลาไรเซชันของแมโครฟาจ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ classical-M1 และ alternative-M2 โดยเซลล์แมโครฟาจ M1 จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ Th1 ในกระบวนการทำลายเชื้อจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็ง ส่วนเซลล์แมโครฟาจ M2 กระตุ้นกระบวนการกำจัดเชื้อ การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การพัฒนาของเซลล์มะเร็ง และการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการโพลาไรเซชันนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน หรือเพิ่มความรุนแรงของโรคได้ จากการศึกษาพบว่าเมื่อติดเชื้อในเนื้อเยื่อเป็นเวลานาน ทำให้พัฒนาเป็นการติดเชื้อเรื้อรังซึ่งสัมพันธ์กับการพบเซลล์แมโครฟาจ M2 เมื่อมีการติดเชื้อจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Coxiella burnetii*, *Yersinia enterocolitica* และ *Mycobacteria* (94-97) ยังพบการแสดงออกของโปรตีน CD206 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของกระบวนการโพลาไรเซชันของแมโครฟาจ ชนิด Alternative-M2 (98) และเมื่อกระตุ้นจะพบการแสดงออกของ IL-10 ในระดับสูง อีกทั้งในการศึกษานี้ยังพบโปรตีนตัวรับชนิด Toll-like receptor 4 (TLR-4) ซึ่งเป็นตัวรับในการกระตุ้นการทำงานของ antigen presenting cell (APC) แสดงออกในระดับต่ำ อาจส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อแบคทีเรียต่ำลงเมื่อเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ถึงแม้ว่าจะพบการกระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิด IL-6 และ

TNF- α แต่กลับไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของ IL-1 β และ IL-23 ระหว่างแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *N. gonorrhoeae* ซึ่งทั้ง IL-6 IL-1 β และ IL-23 เป็นไซโตไคน์สำหรับกระตุ้นการทำงานของ T-cell ดังนั้นการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์เหล่านี้อาจยังไม่พอในการกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะ (adaptive immunity) โดยผ่านทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง (co-stimulatory molecule) จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปความเป็นไปได้ว่า กลไกดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและยังไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียให้หมดไป นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของ programmed death ligand 1 (PD-1) (89) ที่มีคุณสมบัติกีดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสภาวะจำเพาะ เช่น ภาวะต่อต้านภูมิตนเอง (autoimmune disease) และการตั้งครรภ์ (99, 100) การทดลองนี้ยังพบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell ชนิด CD4 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ RAW 264.7 (89)

2. การปรับเปลี่ยนกระบวนการของฟาโกโซมภายในเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์ผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส จะมีการสร้างถุงฟาโกโซมล้อมรอบตัวเชื้อเกิดขึ้นเป็นถุงฟาโกโซมระยะแรก (early phagosome) และจะพัฒนาเป็นถุงฟาโกโซมระยะท้าย (late phagosome) แล้วเกิดการรวมตัวกับถุงไลโซโซมที่บรรจุเอนไซม์ในการย่อยทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่ผลการศึกษาของ Ibrahim และคณะ พบว่าโปรตีน Porin B ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มถุงฟาโกโซมได้ และทำให้การพัฒนาถุงฟาโกโซมใช้เวลานานขึ้น ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีนแอนนิซิน (annexin II) ตัวรับโปรตีนทรานสเฟอริน (transferrin receptor) โปรตีน Rab5 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของถุง early phagosome ในระดับสูง ในขณะที่พบการลดลงของโปรตีน cathepsin D และโปรตีน Rab7 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของถุง late phagosome อีกทั้งยังพบว่าในถุงฟาโกโซมที่มีการรวมตัวกับถุงไลโซโซม (phago-lysosome) มีการขนส่งเอนไซม์ Cathepsin D ไปยังถุงฟาโกโซมลดลงแสดงถึงการทำงานของกลไก oxygen independent killing ลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่แมคโครฟาจใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับที่พบหลักฐานว่าจำนวนของโปรตีน PorB และพอร์มที่พร้อมทำงาน (active) บ่งชี้ถึงการเจริญและยังมีชีวิตของเชื้อภายในเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของถุงฟาโกโซมที่ช้าลงกว่าปกติ (15) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของคณะ H. S. Seifert ที่พบจำนวนเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในแมคโครฟาจเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแมคโครฟาจชนิด THP-1 และ U937 ร่วมกับเชื้อ แต่ไม่พบการเกาะกันของเชื้อกับโปรตีน lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) ของถุงไลโซโซม เมื่อตรวจสอบด้วยภาพถ่ายเพิ่มเติม จึงพบการห่อหุ้มเชื้อของถุงฟาโกโซมลดลง จึงมีข้อสรุปว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถหลบออกจากถุงฟาโกโซมไปสู่ไซโตพลาสซึมของแมคโครฟาจและยังหลบออกสู่ภายนอกเซลล์แมคโครฟาจได้โดยไม่มีการสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ของแมคโครฟาจ (88)

3. การปรับตัวต่อสภาวะที่มีเหล็กต่ำภายในแมคโครฟาจ เมื่อร่างกายติดเชื้อจุลินทรีย์ จะเกิดกระบวนการปรับเปลี่ยนสภาวะภายในเพื่อต่อต้านการติดเชื้อ กลไกหนึ่งที่ร่างกายใช้ ได้แก่ การจำกัดระดับของธาตุเหล็ก เนื่องจากธาตุเหล็กเป็นธาตุสำคัญที่เชื้อจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโต โดยร่างกายจะเพิ่มระดับการแสดงของโปรตีนเฮปซิดิน (hepcidin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมกลไกหลักของธาตุเหล็ก (master iron-regulating) ทำหน้าที่ในการลดการดูดซึมธาตุเหล็กที่ลำไส้และ

รักษาธาตุเหล็กไว้ในเซลล์แมคโครฟาจโดยลดการแสดงออกของโปรตีนเฟอร์โรพอติ (ferroportin) ที่ทำหน้าที่ขนส่งธาตุเหล็กบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (101) รวมถึงการหลั่งโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial protein) ชนิด NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) เป็นโปรตีนขนส่งเหล็ก (iron carrier protein) สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และมีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลชีพ โดยการสลายซิเดอโรพอร์ (siderophore) ของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (102) กลไกดังกล่าวทั้งหมดของร่างกาย เรียกว่า iron-limiting innate immune defense (103) กลไกนี้มีผลต่อระดับของธาตุเหล็กและการมีชีวิตของเชื้อในเซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีอีกบทบาทสำคัญต่อการรักษาสมดุลของธาตุเหล็ก (iron homeostasis) โดยทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงและรีไซเคิลธาตุเหล็ก อีกทั้งยังเป็นเซลล์ที่สำคัญในระบบ innate immunity (104) จากการศึกษาของคณะ S. M. Zughair พบว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถปรับตัวให้มีชีวิตรอดในสภาวะที่ร่างกายเกิดกลไก iron-limiting innate immune defense โดยกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มโปรตีน hepcidin, NGAL และ NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) ซึ่ง NRAMP1 เป็น intracellular iron transporter ที่ทำหน้าที่ในการขนส่ง รีไซเคิลธาตุเหล็กจากเอนโดโซมไปยังไซโตพลาสซึม และจัดเก็บในรูปเฟอร์ริติน (ferritin) (105) และยังคงลดการแสดงออกของโปรตีน BDH2 (3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2) ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการลดความเป็นพิษ (detoxify) ของธาตุเหล็กในไซโตพลาสซึม เมื่อเซลล์เกิดมีธาตุเหล็กสะสมภายในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก (106) ด้วยกลไกทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นส่งผลให้ระดับของธาตุเหล็กภายในแมคโครฟาจสูงขึ้น เชื้อจึงมีธาตุเหล็กใช้เพื่อการมีชีวิตภายในแมคโครฟาจได้ อีกทั้งยังส่งเสริมการขนส่งเชื้อด้วยการเคลื่อนที่ของเซลล์แมคโครฟาจผ่านเซลล์เยื่อบุผิวทำให้เพิ่มโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อภายในร่างกายได้ (16)

4. การต่อต้านและยับยั้งการทำงานของ reactive oxygen species (ROS) ภายในแมคโครฟาจ ภายหลังกระบวนการฟาโกไซโทซิส จะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ ROS ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย การทำงานของ ROS ภายในเซลล์แมคโครฟาจจะทำงานเป็นชุดของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดยเอนไซม์ NADPH oxidase จะทำหน้าที่เปลี่ยนออกซิเจนให้อยู่ในรูปไอออนหรือซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide: O_2^-) และจะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) เมื่อเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสและเกิดการสร้างถุงฟาโกโซม จะพบเอนไซม์ไมอีโลเปอร์ออกซิเดส (myeloperoxidase: MPO) จากแกรนูลในไซโตพลาสซึม จะถูกปล่อยเข้าสู่ถุงฟาโกโซม และเปลี่ยน H_2O_2 เป็นกรดไฮโดรคลอริก (HOCl) ที่มีฤทธิ์ทำลายไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรีย แต่รายงานของ D. R. Lorenzen และคณะ พบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่แยกได้จากมนุษย์เมื่อทดสอบกับโปรตีน Porin ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* และกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโทซิสด้วยเม็ดบีด (latex bead) พบว่าโปรตีน Porin สามารถปรับเปลี่ยนกระบวนการ oxidative burst ของ ROS ได้ (17) โดยสามารถยับยั้งขั้นตอนการเปลี่ยน H_2O_2 เป็น HOCl โดยยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ MPO จาก azurophilic granule (107) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการ oxidative burst เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (108)

2.7.2 การปรับเปลี่ยนกระบวนการตายของแมคโครฟาจโดยเชื้อ *N. gonorrhoeae* (Modification of cell death process)

เซลล์ในร่างกายเมื่อมีการเสื่อมสภาพ หมดอายุขัย หรือมีการกลายพันธุ์กลายเป็นเซลล์มะเร็ง รวมถึงการมีพยาธิสภาพและการติดเชื้อจุลชีพ เซลล์จะมีกระบวนการตายเพื่อกำจัดเซลล์เหล่านั้นเกิดขึ้น กระบวนการตายของเซลล์มีหลายรูปแบบ อาทิเช่น กระบวนการอะพอพโทซิสและออโตฟาจี (autophagy) แม้ว่าร่างกายจะพยายามใช้กระบวนการเหล่านี้ในการกำจัดเชื้อจุลชีพ แต่เชื้อยังสามารถปรับเปลี่ยนและยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ได้ กระบวนการอะพอพโทซิสเป็นกระบวนการตายของเซลล์รูปแบบหนึ่ง โดยการกระตุ้นผ่าน 2 วิถีกลไก ได้แก่ 1. กลไกที่เกิดจากกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) และรับส่งสัญญาณผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ 2. กลไกที่เกิดจากการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายในเซลล์ (intrinsic pathway) โดยสิ่งเร้าภายนอกจะส่งผลให้สภาวะภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลของเอนไซม์ไซโตโครมซี (cytochrome c) จากไมโทคอนเดรีย กลไกทั้ง 2 วิถีนี้ ทำให้เกิดการดำเนินงานของเอนไซม์แคสเปส (caspase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการอะพอพโทซิส โดยมีผลทำให้เกิดการสลายของสารพันธุกรรมและส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ (109)

กระบวนการออโตฟาจี หรือ self-eating เป็นหนึ่งในกระบวนการรักษาสสมดุล (homeostasis) พื้นฐานของเซลล์ มีบทบาทในการกำจัดองค์ประกอบภายในเซลล์และสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เสื่อมสภาพหรือไม่จำเป็นให้กลายเป็นโมโนเมอร์ (monomer) เช่น กรดอะมิโน เพื่อการนำไปใช้ใหม่หรือเก็บรักษาไว้ภายในเซลล์ กระบวนการออโตฟาจีอาศัยการทำงานของถุงไลโซโซมรวมตัวกับถุงฟาโกโซมซึ่งบรรจุสารชีวโมเลกุลที่เซลล์ต้องการกำจัดและเกิดจากเซลล์ดำเนินการเอง (autophagosome) (110) บทบาทหนึ่งที่สำคัญของกระบวนการออโตฟาจีภายในร่างกาย คือ การกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อจุลชีพ เพื่อทำลายจุลชีพและยับยั้งการเกิดพยาธิสภาพของการติดเชื้อในร่างกาย ผลการศึกษาของ Zughair และคณะ พบว่ากระบวนการออโตฟาจีภายในแมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในขั้นตอน autophagic flux หรือการรวมกันของ autophagosome กับถุงไลโซโซมมีระดับลดลง (18) หากขั้นตอนนี้ถูกยับยั้งจะทำให้กระบวนการออโตฟาจีไม่มีประสิทธิภาพหรือเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ (111) โดยพบว่ามีกรดไขมัน phosphoethanolamine (PEA) บริเวณ lipid A ในส่วน LOS ของเชื้อ ทำให้มีบทบาทสำคัญต่อการปรับเปลี่ยนกระบวนการออโตฟาจี เชื้อจึงมีชีวิตรอดภายในแมคโครฟาจนานขึ้น เมื่อกระบวนการเกิดออโตฟาจีของเซลล์ลดลง ทำให้การสร้างถุง autophagosome ลดลงด้วย รวมทั้งลดอัตราการเกิดขึ้นตอน autophagic flux ที่เป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการออโตฟาจี (18)

นอกเหนือจากกระบวนการออโตฟาจีแล้ว เชื้อ *N. gonorrhoeae* ยังสามารถปรับเปลี่ยนกระบวนการอะพอพโทซิสเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจมีชีวิตรอดนานขึ้นได้ ผลการศึกษาวิจัยในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากมนุษย์ (human primary macrophage) พบว่าในเซลล์แมคโครฟาจที่มีเชื้อ *N. gonorrhoeae* อยู่ภายใน จะไม่พบการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีเชื้อ *N. gonorrhoeae* ซึ่งเอนไซม์ caspase-3 เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการฟาโกไซโทซิส หรือในกลุ่มที่มีการกระตุ้นการอะพอพโทซิสด้วย

สาร staurosporine (STS) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ในเซลล์ที่มีเชื้อ *N. gonorrhoeae* ลดลงมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีเชื้อเช่นเดียวกัน (88)

2.8 Extracellular vesicles (EVs)

Extracellular microvesicles (EVs) ถูกค้นพบในปี 1960 เป็นถุงเวสิเคิลที่มีขนาดเล็กมาก ประมาณ 1 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเกล็ดเลือด (112) มีการค้นคว้าเกี่ยวกับถุงเวสิเคิลทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในเซลล์ (in vivo) พบการสร้างและปล่อย EVs ในเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด โดยเวสิเคิลนี้มีบทบาทในการสื่อสารระหว่างเซลล์ และส่งเสริมการก่อพยาธิสภาพของจุลชีพผ่านสารชีวโมเลกุลที่ถูกบรรจุอยู่ภายใน เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก หรือไขมัน (113) EVs สามารถจำแนกออกเป็น 5 ชนิด ตามเกณฑ์ของเซลล์ที่ผลิตถุงเวสิเคิลออกมา ดังตารางที่ 2 ได้แก่ 1. ไมโครพาร์ติเคิล (microparticle) เป็นถุงเวสิเคิลที่เกิดจากการเอกโตไซโตซิส (ectocytosis) หรือการหลุดลอกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (112) โดยมีขนาดประมาณ 50-2,000 นาโนเมตร (114) 2. รีโทรไวรัสไลค์พาร์ติเคิล (retrovirus-like particles: RLPs) เป็นเวสิเคิลที่หลังจากเซลล์ที่มีการติดเชื้อและไม่มีการติดเชื้อไวรัสภายหลังการติดเชื้อไวรัสในร่างกาย มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 75-100 นาโนเมตร 3. อะพอพโทติกบอดี้ (apoptotic bodies) หลั่งโดยเซลล์ที่กำลังเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 500-4,000 นาโนเมตร (24) 4. เอกโซโซม (exosomes) เป็นถุงเวสิเคิลที่สร้างขึ้นในเอนโดโซมของเซลล์ และเซลล์จะมีการหลั่งออกมาภายนอก (115) โดยมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 30-100 นาโนเมตร และ 5. แบคทีเรียลเอ็กซ์ตราเซลลูลาร์เวสิเคิล (bacterial extracellular vesicles) เป็นถุงเวสิเคิลที่บรรจุขึ้นส่วนของเยื่อแบคทีเรีย เช่น ผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane vesicle: OMVs) และส่วนมากถูกผลิตจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดที่เยื่อเมมเบรน (membrane stress) มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 10-300 นาโนเมตร โดยเวสิเคิลชนิด exosomes เป็น EVs ที่ได้รับความสนใจมากที่สุดในการศึกษาค้นคว้าหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพของโรค (biomarkers) และสารที่มีฤทธิ์ในการรักษา (therapeutic agents)

ตารางที่ 2 ชนิดและขนาดของ extracellular vesicles แต่ละชนิด (24)

Extracellular vesicles	ขนาด (นาโนเมตร)
Microparticles	50-2,000
Retrovirus-like particles	75-100
Apoptotic bodies	500-4,000
Exosomes	30-100
Bacterial cellular vesicles	10-300

2.8.1 Microparticles (MPs)

ไมโครพาร์ติเคิล ถูกพบครั้งแรกโดย Wolf ในปี ค.ศ. 1967 จากการสังเกตเห็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายฝุ่นอยู่บริเวณรอบๆ เกล็ดเลือดที่อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นการทำงาน (116) ในคนปกติสามารถพบไมโครพาร์ติเคิลในกระแสโลหิตได้ โดยพบเป็นไมโครพาร์ติเคิลจากเกล็ดเลือดประมาณ 70-80 เพอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นไมโครพาร์ติเคิลจากเม็ดเลือดแดง แต่ระดับของไมโครพาร์ติเคิลสามารถเพิ่มขึ้นได้ในสภาวะต่างๆ อาทิเช่น กลุ่มโรคแพ้ภูมิตัวเอง โรคหลอดเลือดแดงแข็ง มะเร็งและการติดเชื้อ (117) โดยไมโครพาร์ติเคิลมีขนาดประมาณ 100-1,000 นาโนเมตร ถูกปล่อยออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านกระบวนการ ectocytosis หรือการแตกหน่อของเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาเป็นเวสิเคิลที่มีฟอสโฟลิปิดห่อหุ้ม ดังนั้นบริเวณเยื่อหุ้มของไมโครพาร์ติเคิลจึงพบการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์ที่เกิดการหลั่งไมโครพาร์ติเคิล โดยไมโครพาร์ติเคิลสามารถแยกออกจากถุง exosomes ได้ด้วยขนาด เนื่องจากถุง exosomes มีขนาดน้อยกว่า 100 นาโนเมตร และไมโครพาร์ติเคิลมีบทบาทเป็นตัวขนส่งข้อมูลชีวภาพและการสื่อสารระหว่างเซลล์ (118)

กระบวนการสร้างไมโครพาร์ติเคิล (microparticles formation process) เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจากสารกระตุ้น การเกิดการอักเสบ การแข็งตัวของเลือด การอะพอพโทซิส ตลอดจนเซลล์ที่กำลังมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) โดยกระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการเรียงตัวใหม่ของฟอสโฟลิปิด นำไปสู่สภาวะความไม่สมมาตรของฟอสโฟลิปิดทำให้เกิดการเผยฟอสโฟติลเซอร์อิน (phosphatidyl serine) ของเยื่อหุ้มเซลล์ กระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยเอนไซม์สแครมเบลส (scramblase) และเอนไซม์ฟลอปเปส (floppase) ถูกกระตุ้นให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟลิปเปส (flippase) (119) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งอะมิโนฟอสโฟลิปิด (aminophospholipid) เช่น ฟอสโฟติลเซอร์อิน (phosphatidyl serine) จากส่วนนอกของเยื่อหุ้มเซลล์สู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเกิดความไม่สมดุลกันของฟอสโฟลิปิด และพบการสะสมของแคลเซียม รวมถึงแคลเซียมยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คาลเพออิน (calpain) และเอนไซม์เจลโซลิน (gelsolin) ทำให้มีการย่อยโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของไซโตสเกลิตัน เกิดการสลัดตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ออกเป็นไมโครพาร์ติเคิล (120)

ส่วนประกอบของไมโครพาร์ติเคิล (microparticles component) ผิวของไมโครพาร์ติเคิล ประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลที่บ่งชี้ถึงเซลล์ที่สร้างไมโครพาร์ติเคิล ทำให้สามารถบอกได้ว่าไมโครพาร์ติเคิลนี้มีที่มาจากเซลล์ใด นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยตัวรับ และโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติดที่มีความจำเพาะสำหรับการส่งสัญญาณกับเซลล์เป้าหมาย รวมถึงประกอบไปด้วยกลุ่มของไซโตไคน์ เอนไซม์ เอ็มอาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ สามารถส่งผ่านไปยังเซลล์เป้าหมายได้ โดยมีบทบาทในการเกิดกระบวนการอักเสบ และการแข็งตัวของเลือดเมื่อเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (sepsis) (121)

ไมโครพาร์ติเคิลประกอบด้วย phosphatidyl serine เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญต่อสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่อการติดเชื้อ บทบาทในกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยเฉพาะกลุ่มของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่เกี่ยวข้องกับวิตามินเค (vitamin K-dependent coagulation factors)

บทบาทต่อการกำจัดเซลล์ที่เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสและบทบาทต่อกระบวนการอักเสบ เมื่อเกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต ภาวะเลือดเป็นพิษ (sepsis) จะกระตุ้นกลไกการห้ามเลือด (hemostasis) ได้ ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดภายในเส้นเลือด เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือดของเชื้อ *Neisseria meningitidis* พบว่าไมโครพาร์ติเคิลมีบทบาทหลัก ในการกระตุ้นการเกิดการแข็งตัวของเลือดในร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งโปรตีน tissue factor (TF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (122)

2.8.2 Retrovirus-like particles (RLPs)

Retrovirus-like particles (RLPs) เป็นเวสิเคิลที่คล้ายกับเวสิเคิลของไวรัสชนิด Retrovirus แต่ไม่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อ เนื่องจากไม่พบการบรรจุยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนในการเข้าเซลล์ และการแพร่กระจายของไวรัส ขนาดของ RLPs ประมาณ 75-100 นาโนเมตร และภายในบรรจุชิ้นส่วนโปรตีนของ retrovirus (123) จุดเริ่มต้นของการสร้าง RLPs ยังคงอยู่ในขั้นตอนการศึกษา แต่การสร้าง RLPs อาจเกิดจากการกระบวนการแปลรหัสของยีนบริเวณ human endogenous retrovirus sequences (HERV) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่พบได้ในจีโนมของมนุษย์ ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ รหัส HERV ถูกจัดเป็นกลุ่ม โดยเรียงตามตัวอักษรภาษาอังกฤษ แต่พบว่ามีเพียง HERV-K เท่านั้นที่บรรจุลำดับเบสบริเวณ open reading frame (ORF) ของโปรตีน retrovirus ได้แก่ บริเวณลำดับเบส *gag*, *env*, *rec* และ *pol* (124) บริเวณลำดับเบสเหล่านี้สามารถแสดงออกได้ในขณะที่เซลล์มีความเครียด เช่น การได้รับรังสี สารเคมี การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนหรือไซโตไคน์ และการเกิดมะเร็ง (125, 126) RLPs ถูกหลั่งโดยการแตกหน่อของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *gag* กับส่วนประกอบต่างๆ ในเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงโปรตีนในกลุ่มไซโตสเกเลตัน (127-129)

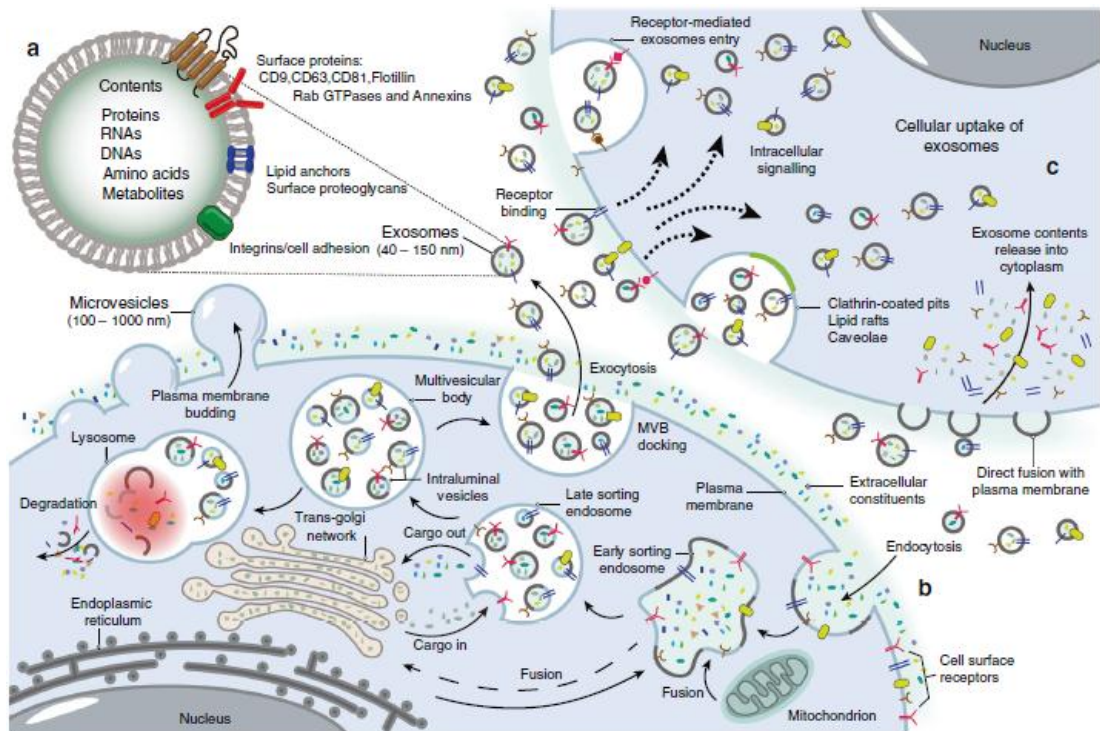
2.8.3 Apoptotic bodies

Apoptotic bodies เป็นถุงเวสิเคิลขนาด 500-4,000 นาโนเมตร หลั่งออกมาจากเซลล์ที่เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส โดยกระบวนการอะพอพโทซิสเริ่มจากการอัดแน่นของโครโมโซม ตามด้วยกระบวนการอื่นๆ ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์หดรัด (membrane blebbing) การสลายตัวของส่วนประกอบภายในเซลล์ซึ่งจะถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการหลุดออกมาเป็นอะพอพโทติกบอดี (apoptotic bodies) (130) apoptotic bodies แตกต่างจาก extracellular microvesicles อื่นๆ โดยพบเฉพาะเซลล์ที่เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ (program cell death) เท่านั้น (131) เวสิเคิลชนิดนี้จะถูกกำจัดด้วยแมคโครฟาจ โดยตัวรับบนแมคโครฟาจจะจับกับ apoptotic bodies อย่างจำเพาะ เนื่องจากการเกิดอะพอพโทซิสจะเกิดการย้ายโมเลกุลของฟอสฟาติลเซอร์อิน (phosphatidyl serine) มาที่ยีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการหลุดออกมาเป็น apoptotic bodies โมเลกุลของฟอสฟาติลเซอร์อินนั้นจะจับกับโมเลกุลของแอนนิซินห้า

(annexin V) บนแมคโครฟาจ นอกจากนี้ยังเกิดร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลบนผิวของ apoptotic bodies ตรงบริเวณโปรตีน thrombospondin ทำให้ C3b บนแมคโครฟาจสามารถเข้าจับกับโปรตีนทั้งสองชนิด (132) ผลศึกษาของ A. Bergsmeth และคณะที่ทดสอบถ่ายโอนยีนมะเร็งแบบแนวราบ (horizontal transfer) ด้วยการรับ apoptotic bodies จากเซลล์ของหนู โดยวิธีทรานสเฟกชัน (transfection) ด้วย H-rasV 12 หรือ Human c-myc พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ของหนูสูญเสียคุณสมบัติหยุดการแบ่งตัวเมื่อเซลล์เจริญมาชนกัน (contact inhibition) ซึ่งบ่งชี้สถานะเซลล์มะเร็ง จึงสรุปได้ว่า apoptotic bodies สามารถถ่ายโอนข้อมูลทางพันธุกรรมได้เช่นเดียวกับ exosomes และ microparticles (133)

2.8.4 Exosomes

กระบวนการสร้าง exosomes เกิดขึ้นตั้งแต่มีการสร้างถุงเอนโดโซมขึ้นจากการสะสมของอินทราลูมินอลเวสิเคิล (intraluminal vesicles: ILVs) ซึ่งเป็นถุงเวสิเคิลที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์และสารชีวภาพที่ถูกนำมารีไซเคิล เช่น การนำเยื่อหุ้มเซลล์กลับมาใช้ใหม่ กระบวนการสร้าง ILVs เป็นกระบวนการปกติที่เกิดขึ้นของถุงเอนโดโซม ภายใน exosomes จะบรรจุกรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) รวมถึงไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) รวมถึงโปรตีน และไขมัน หน้าที่ของ exosomes จะเกี่ยวข้องกับการสื่อสารระหว่างเซลล์ ผ่านการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ บนผิวของเยื่อหุ้ม ได้แก่ โปรตีนแอลฟาอินทีกริน (α -integrin) และเบต้าอินทีกริน (β -integrin) อิมโมโนโกลบูลิน (Immunoglobulin family) และเอนไซม์เซลล์เซอเพสเปปติเดส (cell-surface peptidase) ซึ่งจะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมายยังมีส่วนประกอบด้วยโครงสร้างร่างแหไขมัน (lipid raft) เช่น โฟลติลลินหนึ่ง (flotillin-1) ที่ทำหน้าที่จับตัวรับเซลล์เป้าหมายเช่นเดียวกัน (134) อัตราการบรรจุสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ สามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิด endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) เช่น โปรตีน ALIX และ TSG101 (135) เมื่อเกิดการสะสม ILVs จะเกิดกระบวนการสร้าง multivesicular bodies (MVBs) ของถุงเอนโดโซม ทำให้ถุงเอนโดโซมสามารถเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ดังนั้นเมื่อถุงเอนโดโซมเข้าสู่ระยะสุดท้าย (late endosome) จะเกิดการเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์และปล่อย ILVs ออกสู่ภายนอกเซลล์ ในระยะนี้จะเรียก ILVs เหล่านี้ว่า exosomes (23) บนผิวของ exosome ยังประกอบไปด้วยโปรตีนเตตราสแปนิน (tetraspanins) ซึ่งเป็นโปรตีนอนุรักษ์คอยทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีน (protein trafficking) ยังมีกลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณเคลื่อนที่และการคงรูปโครงสร้างของถุง exosomes (136, 137) ได้แก่ โปรตีน CD9 CD63 และ CD81 โดยสามารถใช้โปรตีนเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ของถุง exosomes ได้ (134) exosomes ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ติดเชื้อจะบรรจุสารที่เกี่ยวข้องเชื้อก่อโรค (pathogen-derived factors) มีบทบาทสำคัญต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับร่างกาย เช่น การจับกินเชื้อจุลินทรีย์ของเม็ดเลือดขาว การเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (138, 139)



ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์ โครงสร้าง ส่วนประกอบ และการทำหน้าที่ของ exosomes (140)

exosomes บรรจุสารชีวโมเลกุลของเชื้อจุลชีพ ทั้งกรดนิวคลีอิก โปรตีน หรือไขมัน รวมถึง pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) เมื่อ PAMPs เข้าจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมายจะทำให้การแสดงออกของยีนต่างๆ ของเซลล์เป้าหมายเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการต่างๆ ของยีน ตั้งแต่การถอดรหัส แปรรหัส การปรับแต่งโปรตีนหลังการแปลรหัส ตลอดจนการกำหนดตำแหน่งของโปรตีน (134) บทบาทของ exosomes ต่อการก่อโรคและดำเนินไปของโรค exosomes จะกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์เจ้าบ้าน ผลการศึกษาของ S. Bhatnagar และคณะ พบการกระตุ้นกระบวนการอักเสบและการผลิต exosomes ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella typhimurium* และ *Toxoplasma gondii* พบว่ามีการขนส่งส่วนประกอบของเชื้อแบคทีเรียจากฟาโกโซมไปยังบริเวณต่างๆ ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ และถูกหลั่งออกมาสู่ภายนอกเซลล์ อีกบทบาทของ exosomes ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าสามารถกระตุ้นการกระบวนการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจทั้งที่ไม่มีการติดเชื้อผ่านตัวรับ Toll-like receptor และ myeloid differentiation factor 88-dependent manner คณะวิจัยจึงได้แยก exosomes จากน้ำล้างหลอดลมของหนูที่ติดเชื้อ *M. bovis* BCG พบการบรรจุโปรตีนลิโปอาราบินอแมนแนน (lipoarabinomannan) ภายใน exosomes ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในไมโครแบคทีเรียและสามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจที่ไม่มีการติดเชื้อผลิต TNF- α นอกจากนี้เมื่อนำ exosomes ที่แยกออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจติดเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. bovis* BCG แล้วฉีดให้หนูทดลอง พบว่าสามารถกระตุ้นการผลิต TNF- α และ IL-12 ในหนูทดลองได้เช่นกัน (26)

นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษา exosomes ที่เกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อ *Bacillus anthracis* โดย L. Abrami และคณะ ได้ศึกษาถึง exosomes ที่บรรจุท็อกซิน (toxin) ของเชื้อชนิด anthrax lethal toxin ที่มีส่วนประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ได้แก่ protective antigen (PA) และ lethal factor (LF) ถูกบรรจุและปล่อยออกมาในถุง exosomes ทำให้ท็อกซินคงทน ไม่ถูกทำลายด้วยแอนติบอดีจากระบบภูมิคุ้มกันและส่งผ่านท็อกซินระหว่างเซลล์ได้ เพิ่มการแพร่กระจายของท็อกซิน (27) นอกจากนี้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีปัจจัยก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ แอลฟาท็อกซิน (α -toxin) ซึ่งเป็น pore-forming toxin ซึ่งสามารถแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เจ้าบ้านได้ มีขนาดประมาณ 34 กิโลดัลตัน เป็นโครงสร้างโมโนเมอร์ สามารถประกอบกันเป็นโครงสร้างคล้ายวงแหวนของเจ็ดหน่วยย่อย (heptameric ring-like) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ขณะสร้างฟาโกโซมระยะท้าย (late phagosome) หรือมัลติเวสิคูลาร์บอดี (multivesicular bodies: MVB) ทำให้เกิดการหลั่ง α -toxin ออกมาในรูป exosomes ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการนำเสนอแอนติเจน (antigen presenting) และการกระจายของเชื้อแบคทีเรีย (28)

สำหรับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้มีการศึกษาการหลั่งถุง exosomes จากเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่เพาะเลี้ยง โดย K. Nudel และคณะ พบว่าเชื้อสามารถดำรงชีวิตและปรับเปลี่ยนกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์เยื่อบุผิวได้ ด้วยการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวสร้างถุง exosomes บรรจุโปรตีน cIAP2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะพอพโทซิส 2 (apoptosis-2) ในกระบวนการอะพอพโทซิส คณะผู้วิจัยพบว่าระดับของโปรตีน cIAP2 ภายในเซลล์เยื่อบุผิวสูงขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วยการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* หลังจากนั้นจะมีระดับลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันระดับของถุง exosomes ที่บรรจุโปรตีน cIAP2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นบริเวณภายนอกเซลล์เยื่อบุผิว ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการอะพอพโทซิส ทำให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์เยื่อบุผิวได้ อีกทั้งยังส่งผลให้เชื้อสามารถหลบหลีกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (25) และระหว่างที่มีการติดเชื้อจุลชีพพบว่าส่วนประกอบต่างๆ ของ exosomes มีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์รวมถึงระยะของการติดเชื้อ เนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียสามารถควบคุมการสร้างถุง exosomes ในการกระตุ้น กระจาย และการก่อโรคได้ ในขณะเดียวกันถุง exosomes สามารถผลิตได้จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อของร่างกาย ตัวอย่างเช่น class II major histocompatibility (MHC Class II)-antigen complexes ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ CD4 lymphocyte โดยบรรจุลงในถุง exosomes ที่สร้างจากเซลล์ B lymphocyte และ class I major histocompatibility (MHC Class I) antigen complexes ที่ถูกบรรจุในถุง exosomes ที่สร้างจากเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells) โดยทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ CD8 lymphocyte อย่างไรก็ตามถุง exosomes ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ยังคงความสามารถในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะ (adaptive immune) ได้

ด้วยคุณสมบัติและองค์ประกอบของ EVs จึงเป็นที่สนใจนำมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) โดย exosomes ที่บรรจุสารชีวโมเลกุลของเชื้อจุลชีพมีความคงทนมากกว่าสารชีวโมเลกุลของเชื้อจุลชีพที่ลอยอิสระในกระแสโลหิต ซึ่งสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) และยังป้องกันจากการถูกทำลายด้วยคอมพลีเมนต์ มีรายงานการพบ pathogen-

associated molecular patterns (PAMPs) ในถุง exosomes ที่หลังจากเซลล์ติดเชื้อจุลชีพ เช่น เซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *S. typhimurium* ถุง exosomes นี้จะบรรจุ Salmonella lipopolysaccharide อยู่ภายใน คอยกระตุ้นกระบวนการอักเสบทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง (26) ส่วนเชื้อ *B. anthracis* พบ lethal toxin (LT) บรรจุในถุง exosomes ที่ถูกหลังจากเซลล์ติดเชื้อเพื่อขนส่ง LT ไปยังเซลล์ที่อยู่รอบๆ (27) รวมถึงในการติดเชื้อ *S. aureus* ในถุง exosomes ที่ถูกหลั่งออกมาพบ bacterial pore forming α -toxin มีคุณสมบัติทำให้เซลล์ต่างๆ เกิดรูและถูกทำลาย (28) การศึกษา exosomes ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจติดเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่าถุง exosomes จะกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจทั้งที่มีและไม่มี การติดเชื้อ โดยผ่านการหลั่งโมเลกุลกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจบริเวณอื่นในร่างกายและนิวโทรฟิลส์ให้ เคลื่อนที่มายังปอดเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงขึ้น (26, 141) อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ อักเสบ โดยการกระตุ้นการหลั่ง pro-inflammatory และสามารถยับยั้งการแสดงออกของ MHC Class II และ CD64 immunoglobulin receptor ของแมคโครฟาจที่ไม่มี การติดเชื้อได้ (142) ในการเพิ่มการมีชีวิตรอดของเชื้อโดยยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ถุง exosomes สามารถ บรรจุ glycolipid lipoarabinomannan (LAM) ซึ่งยับยั้งการส่งสัญญาณของตัวรับสัญญาณและ ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ T-cell lymphocyte (143) การแสดงออกของ pathogen-derived factors ในถุง exosomes มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบและระดับของโมเลกุลต่างๆ จำเพาะกับระยะเวลาในการดำเนินของโรค จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นตัวแทนสารบ่งชี้ ชีวภาพได้ (23)

exosomes ถูกนำมาพัฒนาเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพและชุดตรวจสำเร็จรูปครั้งแรก เกิดขึ้นปี ค.ศ. 2016 สำหรับการวินิจฉัยโรคมาเร็งในเลือด ประเทศสหรัฐอเมริกา (144) จากการศึกษาถุง exosomes เพื่อเป็นสารบ่งชี้ชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อนั้นยังเป็น เรื่องใหม่แต่นับว่าเป็นสัญญาณที่ดี โดยเฉพาะโรคติดเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ (intracellular bacterial infection) เช่น การติดเชื้อ *M. tuberculosis* (Mtb) ซึ่งการวินิจฉัยต้องทำโดยการ เพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้เวลานานและกำลังคนสูง หรือการวินิจฉัยด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลที่ จำเป็นต้องใช้สิ่งส่งตรวจที่ได้มาจากบริเวณที่มีการติดเชื้อและอาจมีผลลบปลอมได้อันเนื่องจากระดับ สารพันธุกรรมของเชื้อต่ำ โดยถุง exosomes ที่บรรจุ pathogen-derived factors จะถูกหลังจาก เซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในกระแสโลหิต ผลการศึกษาในสภาวะที่มีการติดเชื้อจะพบอัตราการหลั่งของถุง exosomes เพิ่มขึ้น (141) การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ของถุง exosomes ที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด J774 ที่ติดเชื้อ Mtb จากการศึกษาของ P. K. Giri และคณะ ด้วยการใช้เทคนิค Liquid chromatography และ Mass spectrometry พบโปรตีนของ Mtb ในถุง exosomes จำนวน 41 ชนิด ได้แก่ โปรตีน ESAT-6 (Rv3875), Ag85 complex (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c), MPT64 (1980c) และ MPT63 (1926c) ร่วมกับการพบโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนสูง (29) มีการศึกษาวิเคราะห์ถุง exosomes ด้วยเทคนิค multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) ที่พัฒนาการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* ในระยะกำเริบ (active tuberculosis) และระยะแฝง (latent tuberculosis) ของ N. A. Kruh-Garcia และคณะ ในปี 2014 พบว่าถุง exosomes ในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อ

M. tuberculosis ในระยะกำเริบ ประกอบด้วยโปรตีนของเชื้อ Mtb 20 ชนิด และเปปไทด์หลายชนิด ได้แก่ Antigen 85B, Antigen 85C, Apa, BfrB, GlcB, HspX, KatG, และ Mpt64 และสามารถพิจารณานำมาใช้เป็นชุดของโปรตีนและเปปไทด์ในการวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อ Mtb ในระยะกำเริบได้อีกทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อ *Mycobacterium* ระยะเวลาของการติดเชื้อ รวมถึงระยะของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทำให้การแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ *Mycobacterium* ในถุง exosomes มีการเปลี่ยนแปลงทำให้ใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพเพื่อติดตามระยะการดำเนินไปของโรคและอาจใช้ในการวิเคราะห์หาโอกาสการพัฒนาไปสู่การติดเชื้อระยะกำเริบของผู้ป่วยติดเชื้อในระยะแฝงได้ (30)

2.8.5 Bacterial Membrane vesicles

Bacterial membrane vesicles เป็นถุงเวสิเคิลที่มีการสร้างและหลั่งออกมาจากส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย เรียกว่า outer membrane vesicles (OMVs) โดยการหลั่ง bacterial membrane vesicles ทำให้เกิดการขนส่งและการแพร่กระจายส่วนประกอบของเชื้อแบคทีเรียสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เช่น การสื่อสารของเชื้อแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์ การรักษาความคงอยู่ของโครงสร้างไบโอฟิล์ม การส่งสารพันธุกรรมและที่อกซินผ่านทาง horizontal gene transfer การเพิ่มการมีชีวิตรอดในสิ่งแวดล้อมหรือภายในร่างกาย และการปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (145, 146) การหลั่ง OMVs พบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป โดยเกิดจากการขาดของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและหลุดออกเป็นถุงเวสิเคิล โดยภายใน OMVs บรรจุโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และกรดนิวคลีอิก โดยมีส่วนประกอบเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย เช่น lipopolysaccharide (LPS) หรือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในชั้นเพอริพลาสมิก (periplasmic) และฟอสโฟไลปิด (phospholipids) อีกทั้งการศึกษาในระดับโปรตีโอมิกส์ยังพบโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและไซโตพลาสซึม (147) มีการศึกษาวิจัยด้านโปรตีโอมิกส์ถึงคุณลักษณะและหน้าที่ของ OMVs ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Klebsiella pneumoniae* โดยคณะวิจัยของ J. C. Lee ได้พบโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อแบคทีเรียนี้จำนวน 159 ชนิด ใน OMVs โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการเกิดกระบวนการอักเสบ เช่น IL-1 และ IL-8 ในเซลล์เยื่อหุ้ม เมื่อทดสอบฉีด OMVs นี้ให้หนูทดลองที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ระดับต่ำ พบว่าหนูทดลองกลุ่มนี้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงที่ปอดเช่นเดียวกับหนูทดลองที่มีการติดเชื้อ *K. pneumoniae* (148) มีผลการศึกษาของ OMVs จากเชื้อ *Haemophilus influenzae* กับระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อเซลล์เยื่อหุ้ม โดยคณะวิจัยของ S. W. Sharpe พบว่า OMVs บรรจุโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อ รวมถึงโปรตีนที่เป็นส่วนปัจจัยก่อโรค จำนวน 142 ชนิด เช่น outer membrane protein P5, outer membrane protein P1 precursor, probable D-methionine-binding lipoprotein MetQ และ IgA-specific serine endopeptidases โดยโปรตีนเหล่านี้ ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ ชนิด immunomodulatory cytokine เช่น IL-8 และ IL-37 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ในการเกิด

กระบวนการอักเสบ อีกทั้งการเกาะติดของ OMVs ต่อเซลล์เยื่อหุ้มในคอหอยยังทำให้เกิดกระบวนการ endocytosis เกิดการนำ OMVs เข้าไปในเซลล์เยื่อหุ้ม (149) นอกจากนี้ยังพบว่าสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายใน OMVs ของเชื้อ ได้แก่ LOS และดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของไบโอฟิล์มของเชื้อ ช่วยทำให้เกิดการรักษาความคงตัวของไบโอฟิล์ม (150) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนโอมิกส์ระหว่าง OMVs และ outer membrane ของเชื้อ *N. meningitidis* โดยคณะวิจัยของ M. Lappann พบโปรตีนใน OMVs เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เช่น โปรตีนในกลุ่มขนส่ง (autotransporter proteins) ที่มีบทบาทในการเกาะกลุ่ม การเกาะติดและโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ รวมถึงโปรตีนในกลุ่มควบคุมระบบคอมพลีเมนต์ (complement regulatory proteins) ได้แก่ fHbp, Opc, NspA, และ NhhA ซึ่งกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของโปรตีนไวโทรเนคติน (vitronectin) และโปรตีนที่จับกับเฮปาริน (heparin binding protein) ที่เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการต่อต้านการแข็งตัวของเลือด เพื่อการดำรงอยู่ในกระแสเลือดของเชื้อระหว่างการติดเชื้อในกระแสโลหิต (151) ในส่วนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ และผลของ OMVs ต่อเซลล์เจ้าบ้าน โดยการศึกษาของ Kaparakis และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 พบว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีการขนส่งเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อหุ้มด้วยการบรรจุใน OMVs ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุล Nod1 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทต่อการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในขณะที่เดียวกันเมื่อฉีด OMVs บริเวณกระเพาะของหนูทดลอง พบว่า OMVs สามารถกระตุ้นการทำงานของทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immune system) และแบบจำเพาะ (adaptive immune system) ผ่านการทำงานของโมเลกุล NOD1 ได้ (87) ผลการศึกษาระบบการอะพอพโทซิสโดยปล่อย OMVs ของเชื้อที่บรรจุโปรตีน PorB มีเป้าหมายที่ไมโทคอนเดรีย เพื่อกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิส โดย P. Deo และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 ตรวจสอบโปรตีนโอมิกส์ของ OMVs พบโปรตีนจำนวน 110 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อมากที่สุด เช่น โปรตีน PorB, Opacity, NodT family efflux transport, PilQ และ BamA รวมถึงโปรตีนในกลุ่ม adhesion ได้แก่ โปรตีน MafA โปรตีนในกลุ่มที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ เช่น FtsN และ AmiC และโปรตีนอื่นๆ เป็นโปรตีนที่อยู่ในบริเวณชั้น Periplasmic เช่น โปรตีน SurA, NlpD, NlpA และ metalloproteinase และโปรตีนในไซโตพลาสซึม เช่น โปรตีน GroEL, 30S ribosomal protein S2 และ elongation factor Tu เป็นต้น จึงสรุปได้ว่า OMVs ที่บรรจุโปรตีน PorB ซึ่งพบปริมาณมากที่สุดในเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์แมคโครฟาจ โดยการจับกับเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียหายและเกิดการรั่วไหลของ cytochrome c กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (152)

2.9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบโปรตีนโอมิกส์ (Proteomics Analysis)

โปรตีนโอมิกส์ ถูกใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 โดยโปรตีนโอมิกส์เป็นการศึกษาโปรตีนของสิ่งมีชีวิตในระดับกว้างหรือกล่าวได้ว่าเป็นการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ในสถานะหนึ่ง ทำให้สามารถประเมินความแตกต่างของเซลล์ในแต่ละสถานะได้ ทั้งในด้านการจำแนกชนิด การศึกษา

โครงสร้าง หน้าที่ทางสรีรวิทยา รวมถึงการศึกษาสารบ่งชี้ทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคต่างๆ (153) โดยเทคนิคที่สามารถใช้ในการศึกษาโปรตีโอมิกส์ที่มีโปรตีนหลายพันชนิดรวมกันได้ในครั้งเดียว ได้แก่ เทคนิค 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DGE) และ Mass spectrometry (154)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry (Mass spectrometry analysis: MS) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลของสารหรือธาตุ ด้วยเครื่อง mass spectrometer ผ่านหลักการทำให้สารหรือธาตุแตกตัวเป็นไอออน เทคนิค MS จัดเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยในระดับเฟมโตโมล หรือตั้งแต่ 10^{-15} ถึง 10^{-18} โมล (155) เครื่อง mass spectrometer ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ 1. ส่วนที่ทำให้สารหรือธาตุแตกตัวเป็นไอออน (ion source) 2. ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) และ 3. ส่วนตรวจมวล (detector) ส่วน ion source เป็นส่วนที่ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งมีหลายเทคนิค แต่เทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ (proteomics) ได้แก่ เทคนิค electrospray ionization (ESI) และเทคนิค matrix-assisted laser desorption and ionization (MALDI) เมื่อสารเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ไอออนจะเคลื่อนที่ไปยังส่วน mass analyzer ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการคัดแยกมวลไอออนตามค่า m/z การคัดแยกไอออนมีหลายเทคนิค ได้แก่ 1. Time of Flight (TOF) 2. Ion Trap (IT) และ 3. Fourier transforms ion cyclotron resonance (FTICR) โดยอาจจะพัฒนาใช้เทคนิคส่วนที่ทำให้ไอออนแตกตัวจับคู่กับเทคนิคการวิเคราะห์มวลที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาโปรตีนนั้น เช่น MALDI-TOF, ESI-IT และ ESI-FTICR ส่วน Detector จะทำหน้าที่ตรวจมวล และแสดงออกมาเป็นกราฟระหว่างค่า m/z และ ion intensity หรือเรียกว่า mass spectrum (156)

ในการศึกษาโปรตีโอมิกส์ด้วยเทคนิค MS นั้น จำเป็นต้องย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ให้โปรตีนเป็นชิ้นหลายๆ ขนาด ซึ่งเอนไซม์ทริปซินจะทำการตัดสายพอลิเปปไทด์ (polypeptides) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนจำเพาะ ได้แก่ อาร์จินิน (arginine) และไลซีน (lysine) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer จะได้กราฟ mass spectrum ที่แสดงค่า m/z กับ ion intensity ซึ่งเป็นกราฟ peptide mass spectrum ที่แสดงค่า m/z ของพอลิเปปไทด์แต่ละชิ้น ในปัจจุบันเทคนิคมาตรฐานของการจำแนกชนิดของโปรตีนคือ เทคนิค Tandem Mass spectrometry (MS/MS) (157) โดยเป็นเทคนิคที่ใช้ส่วนวิเคราะห์มวล (mass Analyzer) มากกว่า 1 ตัว โดยเมื่อไอออนของชิ้นส่วนพอลิเปปไทด์ถูกวิเคราะห์ใน mass Analyzer ตัวแรก ไอออนจะถูกทำให้แตกตัวอีกครั้งและเคลื่อนที่ไปยัง mass analyzer ตัวที่สอง โดยจะได้กราฟ mass spectrum เป็นกราฟ amino acid mass spectrum การจำแนกชนิดของโปรตีนจะอาศัยค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของกรดอะมิโนในกราฟ ในการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล (172)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E; Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
2. เครื่อง Refrigerated Centrifuge รุ่น Himac CR21GIII; Hitachi, ญี่ปุ่น
3. เครื่อง Ultracentrifuge; Beckman coulter, สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer รุ่น Evolution 300); Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
5. ตู้บ่ม (CO₂ Incubator); Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
6. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
7. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส; SANYO Electric, ญี่ปุ่น
8. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
9. ตู้ปฏิบัติการเชื้ออย่างปลอดภัย (Biological Safety Cabinets type A2); Labconco, สหรัฐอเมริกา
10. เครื่องถ่ายภาพเจล รุ่น Typhoon FLA 9500; GE Healthcare, สหรัฐอเมริกา
11. เครื่องซั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245; SARTORRES, เยอรมนี
12. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-315; Tomy Tech, สหรัฐอเมริกา
13. กล้อง Inverted Wide-field fluorescence, Deconvolution รุ่น Delta Vision Elite; GE Healthcare, สหรัฐอเมริกา
14. ชุดอุปกรณ์รันเจลแบบ Vertical; Bio rad, สหรัฐอเมริกา
15. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร; Axygen, สหรัฐอเมริกา
16. Conical tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร; Axygen, สหรัฐอเมริกา
17. Pipette filter tips ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร; Neptune Scientific, สหรัฐอเมริกา
18. Autopipette ขนาด 0.2-2, 1-10, 20-100 และ 1,000 ไมโครลิตร; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
19. Multi Channels Autopipette ขนาด 200 ไมโครลิตร; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
20. Serological pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร; Axygen, สหรัฐอเมริกา

21. Pipette boy; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
22. Disposable cuvette; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
23. Cell Culture Flask ขนาด T4, T75 และ T175; Nunc, สหรัฐอเมริกา
24. 96-Wells Plate; Nunc, สหรัฐอเมริกา

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Chocolate Agar; OXOID, อังกฤษ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI); OXOID, อังกฤษ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์ Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640); Gibco, สหรัฐอเมริกา
4. ยาปฏิชีวนะ Gentamicin; Gibco, สหรัฐอเมริกา
5. ยาปฏิชีวนะ Streptomycin; Gibco, สหรัฐอเมริกา
6. Fetal Bovine Serum (FBS); Gibco, สหรัฐอเมริกา
7. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
8. สีย้อม DAPI; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
9. แอนติบอดี Polyclonal Anti-*N. gonorrhoeae* Rabbit; Mybiosource, สหรัฐอเมริกา
10. แอนติบอดี Monoclonal Anti- α -tubulin Mouse Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
11. แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit Ig G (H+L) conjugated Alexa Fluor 488; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
12. แอนติบอดี Chicken Anti-Rabbit conjugated Alexa Fluor 647; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
13. แอนติบอดี Goat Anti-Mouse conjugated Alexa Fluor 568; Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
14. Triton X-100; AMRESCO, สหรัฐอเมริกา
15. Bovine serum albumin (BSA); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
16. PBS powder; Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
17. 30% Acrylamide/Bis-Acrylamide solution; Bio Rad, สหรัฐอเมริกา
18. Ammonium persulfate (APS); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
19. Sodium Dodecyl Sulphate (SDS); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
20. Tetramethyl ethylenediamine (TEMED); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
21. สีย้อม Bromophenol blue; Himedia, อินเดีย
22. สีย้อม Coomassie Brilliant Blue (CBB); Himedia, อินเดีย
23. กรดแอสติค (Acetic acid); Merck, สหรัฐอเมริกา

24. เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin); Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

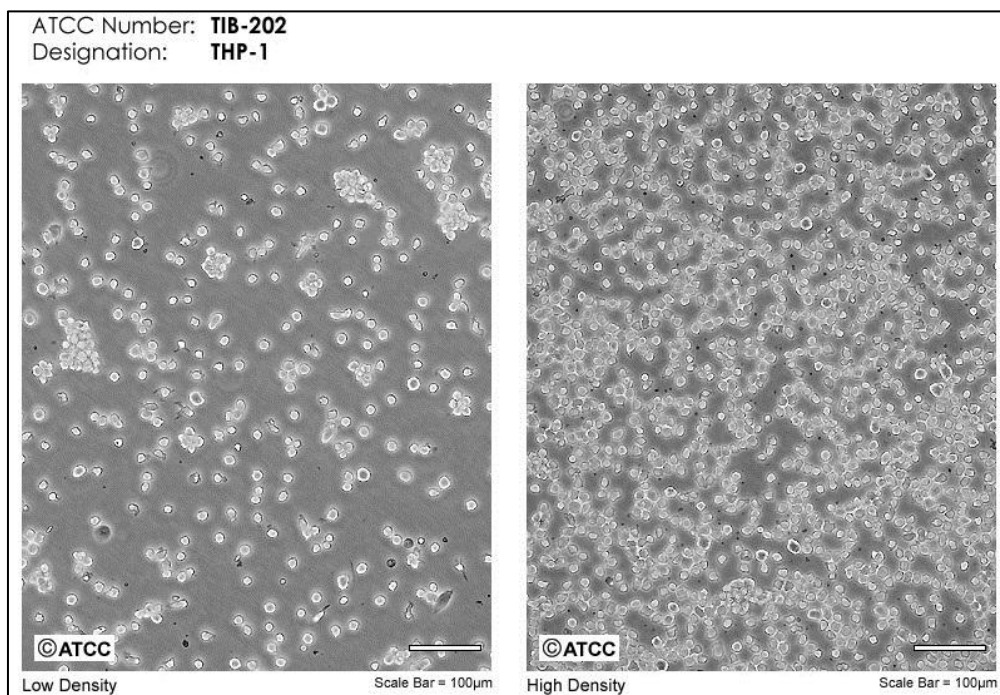
3.2 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae*

เชื้อแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* สายพันธุ์ WHO F โดยเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wide type) และไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Dr. Willa Huston, Faculty of Science, University of Technology Sydney, เครือรัฐออสเตรเลีย ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด chocolate agar โดยทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการถ่ายโคลนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ชนิด brain Heart Infusion (BHI) ที่ผสม fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ วัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) เท่ากับ 0.75 โดยค่าความขุ่นนี้เชื้อจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1x10⁶ CFU/ml

3.2.2 เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์เพาะเลี้ยง THP-1

เซลล์เพาะเลี้ยง THP-1 เป็นเซลล์ชนิดโมโนไซต์ที่ได้จากผู้ป่วยโรค acute monocytic leukemia โดยมีรูปร่างและลักษณะของเซลล์ดังภาพที่ 9 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Dr. Willa Huston, Faculty of Science, University of Technology Sydney, เครือรัฐออสเตรเลีย เซลล์ชนิดเพาะเลี้ยง THP-1 สามารถเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วยสารประกอบ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) เพาะเลี้ยงใน Roswell park memorial institute medium 1640 (RPMI-1640) ที่ประกอบด้วย FBS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะชนิดสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจนตามัยซิน (gentamycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์เพาะเลี้ยง THP-1 (ATCC number : TIB-202) จาก ATCC โดยรูปซ้ายแสดงภาพของเซลล์ในขณะที่มีจำนวนความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ (low density) และรูปขวาแสดงภาพของเซลล์ในขณะที่มีจำนวนความหนาแน่นของเซลล์สูง (high density)

3.3 วิธีการวิจัย

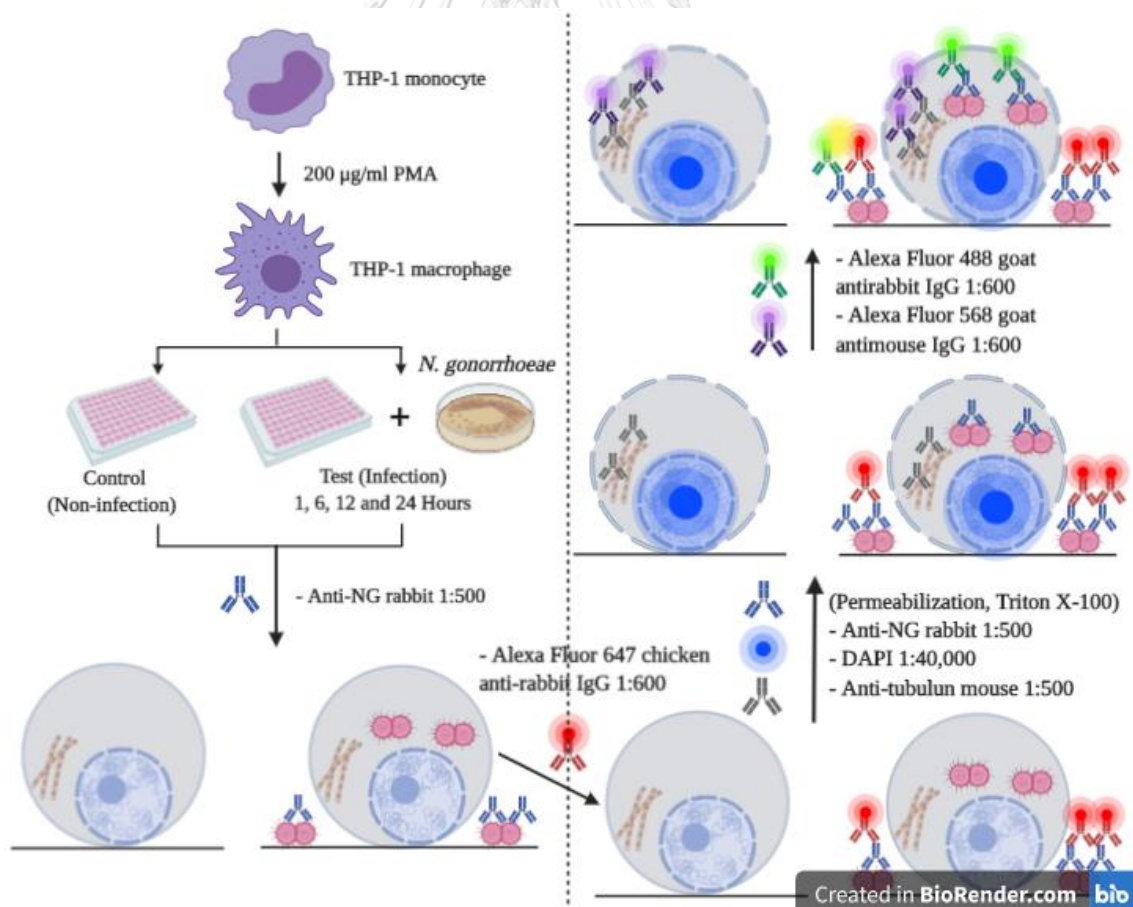
3.3.1 การนับปริมาณเซลล์

การนับปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะทำการดูดเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสี trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน โดยสัดส่วนการเจือจางเป็น 1 ต่อ 2 แล้วทำการดูดเซลล์ที่ผสมกับสี trypan blue เติมลงใน hemocytometer ปริมาตรด้านละ 10 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุ กำลังขยาย 10 เท่า การนับเซลล์จะนับเซลล์ที่ไม่ติดสี trypan blue ทั้งหมด 4 ช่องใหญ่ และทำการคำนวณเป็นความเข้มข้นเซลล์ด้วยสูตรคำนวณ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cells/ml) = (จำนวนเซลล์ ÷ 4) × dilution factor × 10⁴ โดยมีข้อควรระวัง คือ ไม่ควรใช้เวลาในการนับเกินเวลา 5 นาที เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป สี trypan blue สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ที่ยังมีชีวิตได้

3.3.2 การตรวจสอบการติดเชื้อเซลล์แมคโครฟาจด้วยเทคนิค Fluorescence staining

การตรวจสอบการติดเชื้อของเซลล์แมคโครฟาจด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ถูกทำตามขั้นตอนในภาพที่ 10 โดยขั้นตอนแรก เซลล์ THP-1 ถูกเหนี่ยวนำให้เจริญเป็นเซลล์แมคโครฟาจ โดยเตรียมเซลล์ THP-1 ความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะและเติมสารประกอบ PMA ให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในจานชนิด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง โดย PMA จะกระตุ้นให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์แมคโครฟาจและเซลล์เกาะติด เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เตรียมเชื้อ *N. gonorrhoeae* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $1,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทำควบคู่กันระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มทดสอบจะเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 1×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร และในกลุ่มควบคุมทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร โดยทั้งสองกลุ่มการทดลองทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก



ภาพที่ 10 ขั้นตอนในการตรวจสอบการติดเชื้อเซลล์แมคโครฟาจด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์

3.3.2.1 การย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์

นำเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำเซลล์ยึดติดกับผิว (fixing) ด้วยเมทานอล ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ทำการบล็อก (blocking) ด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดึงดูดออก แล้วย้อมส่วน extracellular-*N. gonorrhoeae* ด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (1^o-antibody) ชนิด rabbit anti-*N. gonorrhoeae* polyclonal antibody ด้วยอัตราส่วน 1:500 ถ่ายลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง บนเครื่องหมุนชนิด rocker ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาให้ดูดออก และล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (2^o-Antibody) ที่คอนจูเกตด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด chicken anti-rabbit conjugated Alexa Fluor 647 antibody ด้วยอัตราส่วน 1:600 ถ่ายลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน rocker ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการดูดออก

นำเซลล์มา fix อีกครั้งด้วยเมทานอล ล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ทำ permeabilization ด้วยสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการดูดออก ล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง แล้วทำการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (1^o-antibody) และสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ ที่ตำแหน่ง Intracellular-*N. gonorrhoea* ด้วยแอนติบอดี rabbit anti *N. gonorrhoeae* polyclonal antibody และโปรตีนทูบูลิน (tubulin) ชนิด mouse anti- α -Tubulin monoclonal antibody และสีย้อม DAPI เพื่อย้อมนิวเคลียสของเซลล์ โดยเตรียมเป็นสารละลายหลอดเดียวกันด้วยอัตราส่วน 1:500, 1:500 และ 1:40,000 ตามลำดับ เติมลงหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน rocker ที่อุณหภูมิห้องและดูดออกเมื่อครบเวลา จากนั้นล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (2^o-Antibody) ที่คอนจูเกตด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ ทั้งชนิด goat anti-rabbit Ig G (H+L) conjugated Alexa Fluor 488 antibody และ goat anti-mouse conjugated Alexa Fluor 568 antibody โดยเตรียมเป็นสารละลายหลอดเดียวกันในอัตราส่วนของแอนติบอดีแต่ละชนิด 1:600 เติมลงหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มนาน 45 นาที บน rocker ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการดูดออก ล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร นาน 5 นาที บน Rocker ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการดูดออก แล้วล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ดูดออกให้หมด

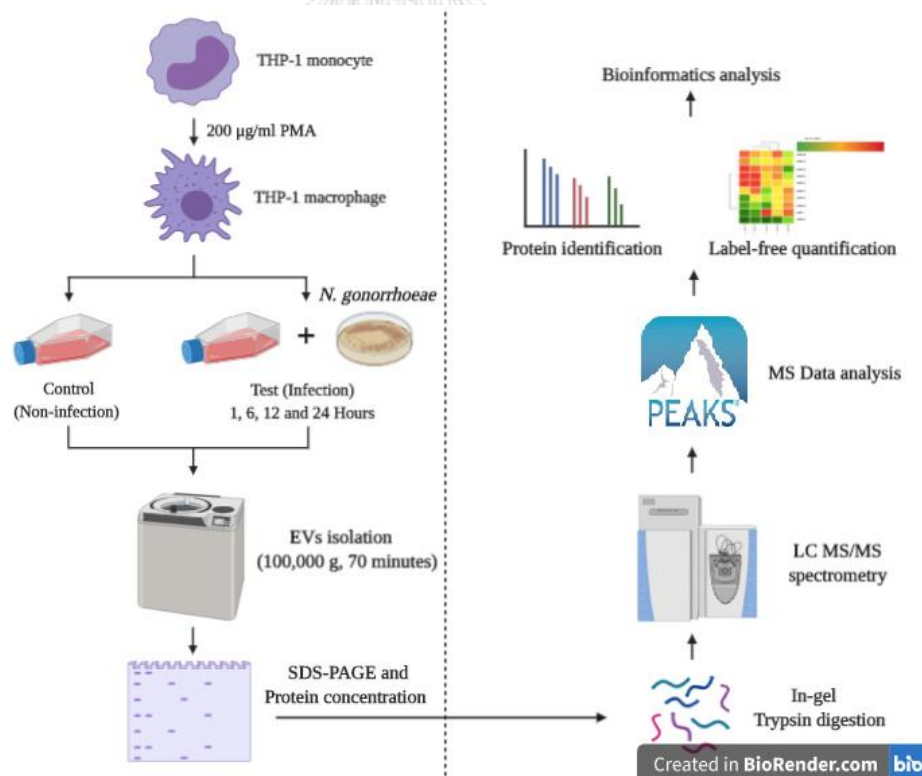
แล้วเติมสารละลาย PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Deconvolution microscope รุ่น DV Elite

3.3.2.2 การวิเคราะห์การติดเชื้อของเซลล์แมคโครฟาจด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

นำภาพที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Deconvolution microscope รุ่น DV Elite จากการถ่ายจำนวน 3 วงกล้องในแต่ละหลุม ทำการวิเคราะห์หาปริมาณการติดเชื้อภายนอกและภายในเซลล์แมคโครฟาจที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Fiji image โดยใช้การวิเคราะห์ colocalization threshold จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าว ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของแสงและสีฟลูออเรสเซนซ์ และคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งสองกลุ่ม ทำการทดสอบทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้การทดสอบ Paired sample T-test และ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 23

3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ของ EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจ

กระบวนการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ของ EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจถูกดำเนินการตามขั้นตอนในแผนภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ขั้นตอนและกระบวนการการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ของ EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจ

3.3.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แมโครฟาจร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* เพื่อแยก

EVs

เตรียมเชื้อ *N. gonorrhoeae* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $1,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที เทอาหาร เลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียาปฏิชีวนะปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมเซลล์ THP-1 เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ THP-1 เจริญเป็นเซลล์ แมโครฟาจโดยปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม ยาปฏิชีวนะ และทำการเติมสารประกอบ PMA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการถ่ายเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 ปริมาตรขวดละ 10 มิลลิลิตรและบ่มในตู้ เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย PMA จะกระตุ้นให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์แมโครฟาจและ เซลล์เกาะติด เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก

นำเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เตรียมเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ THP-1 ที่เหนี่ยวนำให้เจริญเป็นเซลล์แมโครฟาจ โดยในกลุ่มทดสอบจะเติมเชื้อที่มีความเข้มข้น 1×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม ยาปฏิชีวนะ ขวดละ 10 มิลลิลิตร ทั้งสองกลุ่มบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาทำการถ่ายน้ำเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดชนิดปลายแหลม (conical tube) เก็บตัวอย่างในตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาแยก EVs

3.3.3.2 การแยก EVs จากน้ำเลี้ยงเซลล์และ FBS

การแยก EVs จากน้ำเลี้ยงเซลล์และ FBS โดยทำการละลายน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ ทำการเก็บไว้จากตู้แช่ -80 องศาเซลเซียสและ FBS ในส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ เมื่อละลายแล้วทำการ ผสมด้วย vortex ความเร็วสูงสุด 2-3 ครั้ง เทน้ำเลี้ยงเซลล์และ FBS ลงในหลอดชนิด conical tube แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 40 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของเซลล์ที่อาจปนเปื้อนในน้ำเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการดูดส่วนใสถ่ายลงในหลอด ultracentrifuge tube แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว $100,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที เพื่อแยกส่วนของ EVs แล้ว เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอน EVs โดยการเติมสารละลายเย็น PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำไปปั่น ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ $100,000 g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และทำการล้างอีก 2 รอบ

3.3.4 การสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนจาก EVs

3.3.4.1. การสกัดโปรตีนจาก EVs

การสกัดโปรตีนจาก EVs โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) ที่ประกอบด้วยสารประกอบ sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 2X ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปผสมด้วย vortex แล้วทำการดูดส่วนผสมลงในหลอดชนิด microcentrifuge tube บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (spin down) เป็นเวลา 5 นาที ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 5, 2.50, 1.25, 0.625, 0.3125 และ 0.15625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิค serial dilution แล้วทำการเติมสารละลาย sample buffer ปริมาตรหลอดละ 5 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ทำการเตรียมแผ่นเจล Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เติมสารละลายมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตรและสารละลายตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องเริ่ม ตั้งค่ากระแสไฟฟ้า โดยให้ความต่างศักย์คงที่ 150 โวลต์ นานประมาณ 5 นาที จึงนำเจลไปทำ fixing ในสารละลายที่ประกอบด้วยเมทานอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์และกรดอะซิติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วยสี coomassie brilliant blue (CBB) ชนิด G โดยทำการผสมด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราส่วน 1:5 ทำการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกิน (destaining) ด้วยน้ำกลั่น MilliQ ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Typhoon FLA-3500 laser scanner (GE Biosciences) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Densitometry ด้วยโปรแกรมประมวลผล เทคนิคดังกล่าวจะทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยการเทียบภาพถ่ายเจลของตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน BSA

3.3.4.2 การย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ด้วยเทคนิค In-gel digestion

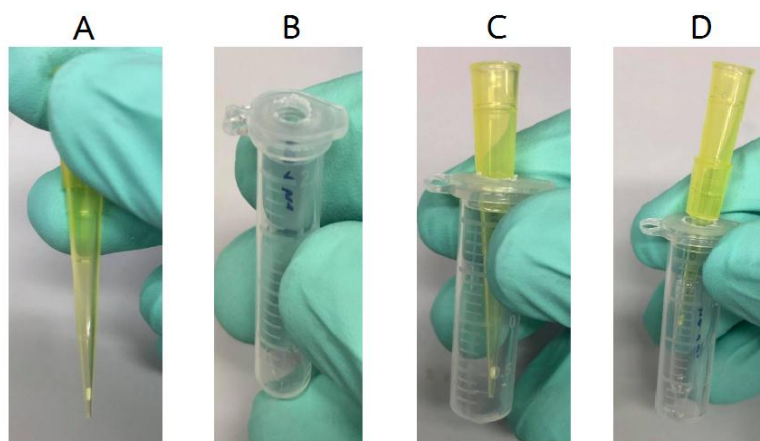
นำเจลบริเวณแถบของโปรตีนที่ได้จาก SDS-PAGE มาตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 ตารางมิลลิเมตร นำชิ้นเจลตัวอย่างใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย acetonitrile (ACN) / NH_4HCO_3 (AMBIC) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อทำการล้างสีย้อม CBB ออกจากตัวอย่างโปรตีน นำไปผสมด้วย vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ดูดสารละลายออก และทำซ้ำอีกครั้ง หลังจากดูดสารละลายออกจนหมด จึงเติม ACN ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อทำการดูดน้ำออกจากเจล (dehydration) นำไปผสมด้วย vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา ดูด ACN ทิ้ง เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นว่าเจลมีลักษณะหดเล็กลงและมีสีขาว หลังจากนั้นทำการเติมเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 12.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยทำการเจือจางเอนไซม์ในสารละลาย AMBIC ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เพื่อคืนน้ำกลับเจล (rehydration) ชิ้นเจลจะดูดซับสารละลาย จากนั้นให้ทำการเติมสารละลาย AMBIC ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หรือให้มีปริมาตร

ท่วมเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน จากนั้นนำเจลไปเขย่า (sonicate) เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการถ่ายสารละลายใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย ACN/Trifluoroacetic (TFA) ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไป sonicate อีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดสารละลายไปรวมกับสารละลาย ส่วนแรกในหลอด microcentrifuge tube นำไปปั่นด้วยเครื่อง Speed Vac เพื่อลดปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยก microparticulate ออก หลังจากนั้นจึงปรับค่า pH ส่วนใสให้มีสถานะเป็นกรด เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน โดยการเติมสารละลาย TFA ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.3.4.3 การทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค STAGE-Tips

ทำการประกอบชิ้นส่วนของ STAGE-Tips ดังภาพที่ 12 โดยการใส่เข็ม ปลายทู่ขนาดเบอร์ 18 เจาะลงบนแผ่นกระดาษ C18 (octadecyl) จนแผ่นกระดาษติดกับปลายเข็ม แล้วนำเข็มใส่เข้าไปใน tips ขนาด 200 ไมโครลิตร จึงดันให้ชิ้นกระดาษลงไปยังปลาย tips แล้วดันให้ ชิ้นกระดาษติดแน่นอยู่กับปลาย tips ดังภาพที่ 12A นำ tips ที่มีชิ้นกระดาษ C18 ใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ทำการเจาะรูบนฝา ดังภาพที่ 12B และ 12C ทำการดูด สารละลายจากข้อ 3.3.4.2 ทั้งหมดลงใน tips นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะไหลลงมายังกันหลอด microcentrifuge หมด เปปไทด์จะเกาะติดกับ ชิ้นกระดาษ C18 หลังจากนั้นดูดส่วนใสเก็บไว้แล้วล้าง 2 รอบ ด้วยสารละลาย isopropanol/TFA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อทำการล้างสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ออกจากเปปไทด์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสารละลาย จะไหลลงมายังกันหลอด microcentrifuge หมด แล้วดูดส่วนใสทิ้ง ทำการเติมสารละลาย TFA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อทำการล้างเกลือที่จับกับเปปไทด์ออก นำไปปั่นที่ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะไหลลงมายังกันหลอด microcentrifuge หมด แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

เตรียมหลอดสำหรับเก็บเปปไทด์ โดยทำการใส่ tips ลงในหลอด autovial แล้วนำไปใส่ในหลอด microcentrifuge เดิม ดังภาพที่ 12D ชะเปปไทด์ (elution) ด้วยการเติม สารละลาย NH₄OH ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน ACN ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน tips นำไป ปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะไหลลงมายังหลอด autovial ทั้งหมด ทำ elution อีกครั้งลงใน tips เดิม แล้วนำไปปั่นอีกครั้งจนสารละลายไหลลงมา จนหมด ทำการย้าย tips ออก แล้วนำไปปั่นให้แห้งในเครื่องปั่น Speed Vac เมื่อสารละลายแห้งแล้ว ทำการย้ายหลอด autovial ไปใส่ลงในหลอด autovial insert แล้วทำการเติมสารละลาย MS loading solvent ที่ประกอบด้วยสารละลาย ACN ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์/TFA ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร



ภาพที่ 12 ส่วนประกอบในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค STAGE-Tips แสดงขั้นตอนการบรรจุแผ่น C18 ที่ได้จากการเจาะด้วยเข็มขนาดเบอร์ 18 ลงไปยังปลาย tips (12A) แสดงการเจาะรูบนฝา microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร (12B) แสดงการประกอบ tips กับ microcentrifuge สำหรับนำไปปั่นด้วย centrifuge (12C) แสดงการประกอบ tips กับ autovial ใน centrifuge สำหรับการเก็บเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (12D)

3.3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometry (LC MS/MS)

ตัวอย่างโปรตีนได้วิเคราะห์โดยหน่วย Proteomic Core Facility, Faculty of Science, University of Technology Sydney เครื่องรัฐออสเตรเลีย ด้วยเครื่อง QSTAR Elite Quadrupole-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Sciex) ซึ่งใช้ Ionization source เป็น Nano-spray โดยตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่เครื่อง mass spectrometer ด้วยเครื่อง autosampler ชนิด Tempo nanoLC system (Eksigen)

3.3.6 การประมวลผลข้อมูลโปรตีโอมิกส์และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Proteomics data processing and quantification analysis)

การจำแนกชนิดและวิเคราะห์เชิงปริมาณของโปรตีน ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS จะถูกประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ ในส่วนของการจำแนกชนิดของโปรตีนนั้น ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์จะถูกเปรียบเทียบกับห้องสมุดโปรตีน (Library) ที่บรรจุภายในโปรแกรมสำเร็จรูป โดยห้องสมุดโปรตีนนี้ประกอบด้วยฐานข้อมูลโปรตีนของมนุษย์ Name: UP000005640 (UniprotKB) จำนวน 74,449 ชนิด และฐานข้อมูลโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* สายพันธุ์ WHO F Name: UP000239837 (UniPrac) จำนวน 2,308 ชนิด โดยฐานข้อมูลทั้งสองทำการสืบค้นวันที่ 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 จากฐานข้อมูล Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) (158) ในส่วนของการจำแนกโปรตีนที่สกัดได้จาก exosomes ของ

FBS ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์จะถูกเปรียบเทียบกับห้องสมุดยีนเดียวกัน การจำแนกชนิดของโปรตีนจะถูกตั้งค่าการวิเคราะห์ต่างๆ ในโปรแกรมสำเร็จรูป ดังนี้ 1. ค่า Parent and Fragment Mass Error Tolerance ที่ 10 ppm และ 0.05 ดัลตัน 2. Modified variation ถูกตั้งไว้ด้วย deamination, oxidation และ propionamide ด้วยค่าสูงสุด 3 ชนิดต่อ 1 เปปไทด์ และ 3. ค่า False discovery rate ที่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการจำแนกชนิดโปรตีนทั้งหมดออกมาแล้ว โปรตีนของมนุษย์ที่เหมือนกับโปรตีนที่สกัดได้จาก exosomes ของ FBS ที่ถูกจำแนกเป็นโปรตีนของมนุษย์จะถูกตัดออก เพื่อลดโปรตีนที่อาจปนเปื้อนมาจาก exosomes ในซีรัมของวัว (FBS) ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นโปรตีนจะถูกวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในช่วงเวลาที่แตกต่างกันด้วยการวิเคราะห์ฟังก์ชัน Label-free quantification จากโปรแกรมสำเร็จรูป โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกนั้น จะทำการเปรียบเทียบเป็นคู่ช่วงเวลา ได้แก่ 1. ชุดควบคุมกับช่วงเวลา 1 ชั่วโมง (0 <-> 1) 2. ช่วงเวลาที่ 1 ชั่วโมงกับ 6 ชั่วโมง (1 <-> 6) 3. ช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงกับ 12 ชั่วโมง (6 <-> 12) และ 4. ช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมงกับ 24 ชั่วโมง (12 <-> 24) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงจากช่วงเวลาหนึ่งไปยังอีกช่วงเวลาหนึ่งจนสิ้นสุดการทดลองได้ เพื่อที่จะใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาตัวแทนโปรตีนสำหรับการใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อที่ระยะการติดเชื้อต่างๆ โดยผลการวิเคราะห์จะได้ค่าการแสดงออกของโปรตีนออกมาเป็นค่า Log₂ ratio และค่านัยสำคัญ (significance) จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way ANOVA โดยโปรตีนจะถูกวิเคราะห์อีกครั้งด้วยการสร้างกราฟ volcano plot ซึ่งเป็นการสร้างกราฟระหว่างค่า Log₂ ratio และค่านัยสำคัญ (significance) โปรตีนที่มีค่า Log₂ ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 2 และค่า significance มากกว่า หรือเท่ากับ 20 จะถูกจัดเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และโปรตีนที่มีค่า Log₂ ratio น้อยกว่า 2 และค่า Significance มากกว่าหรือเท่ากับ 20 จะถูกจัดเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีการแสดงออกลดลง (down regulation) เมื่อได้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณแล้วการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดจะถูกแสดงด้วยแผนภาพ Heat map ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดด้วยระดับของสีตามค่า log₂ ratio ทำให้สามารถเห็นภาพรวมการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด และทำการทดสอบความแตกต่างชนิดของโปรตีนที่จำแนกได้ด้วยการทดสอบทางสถิติด้วยสถิติ Independent T-test และของโปรตีนจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยสถิติ One-Way ANOVA

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (Bioinformatics analysis)

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติ หน้าที่และความสัมพันธ์ของโปรตีน ได้แก่ 1. การเปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนที่มีการแสดงออกทั้งหมด การแสดงออกลดลง และการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่แตกต่างกันเพื่อดูอัตราการแสดงออกของโปรตีนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>: Bioinformatics & Evolutionary Genomics) และทำการตรวจสอบโปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs marker) ในการวิจัยครั้งนี้ โดยการเปรียบเทียบกับโปรตีนจำนวน 100 ชนิดที่ถูกค้นพบมากที่สุด ใน EVs จากฐานข้อมูล Vesiclepedia

database (<http://www.vesiclepedia.org/>) (159) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่ทำกรรวบรวมชนิดของโปรตีน เอ็มอาร์เอ็นเอ ไมโครอาร์เอ็นเอ และลิปิด ใน EVs ที่ถูกค้นพบจากการศึกษาวิจัยทั่วโลก

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีน (Gene ontology) ในด้านต่างๆ 5 ด้าน ดังนี้ Cellular component, Biological process, Molecular function, Protein class และ Pathway โดยโปรตีนของมนุษย์จะถูกวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) (160) และโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoea* จะถูกวิเคราะห์ด้วยฟังก์ชัน gene ontology ในฐานข้อมูล Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) (158) นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนบ่งชี้ของโปรตีนของเชื้อ เพื่อให้ทราบหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด โปรตีนถูกวิเคราะห์หน้าที่ด้วยการวิเคราะห์ cluster of orthologous (COGs) โดยเป็นการวิเคราะห์หาหน้าที่ของโปรตีนโดยอาศัย phylogenetics tree การวิเคราะห์ใช้ฐานข้อมูล WebMGA (161)

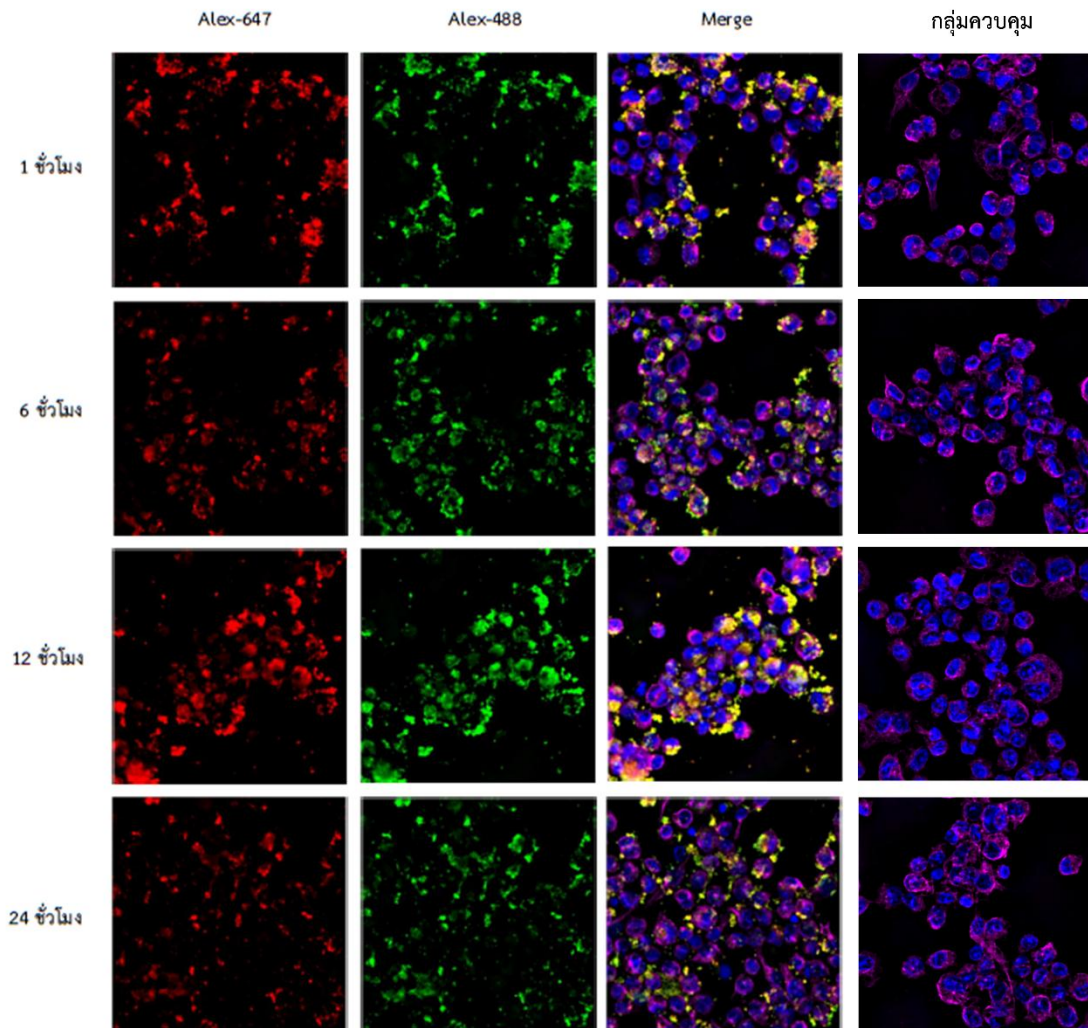
3. การวิเคราะห์ด้านวิถี (Pathway analysis) จะถูกทำการวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (162, 163) เพื่อวิเคราะห์วิถีที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมจากการวิเคราะห์ด้วย gene ontology จากฐานข้อมูล PANTHER และ 4. การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (Protein-protein interaction: PPI) จะถูกวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล STRING (<https://string-db.org/>) (164) ที่ระดับความเชื่อมั่นสูงเท่ากับ 0.7 (high confidence = 0.7) หลังจากนั้นแผนภาพปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน จะถูกทำการ visualization ด้วยโปรแกรม Cytoscape v.3.7.2 (<https://cytoscape.org/>) และ ClueGO v.2.5.7 (165, 166)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

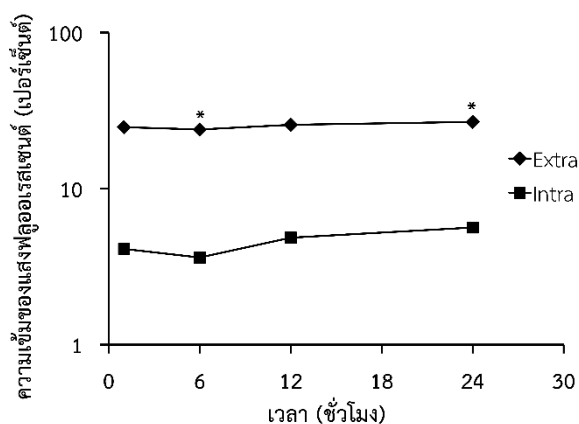
4.1 ผลการวิเคราะห์การติดเชื้อมีผลด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence staining analysis)

ผลตรวจสอบการเกิดฟาโกไซโทซิสของแมคโครฟาจหลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แมคโครฟาจที่ถูกติดตามด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Deconvolution (Delta Vision) จากผลการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแมคโครฟาจสามารถเกิดกระบวนการการฟาโกไซโทซิสได้โดยไม่ต้องการกระบวนการ Opsonization ทำให้พบเชื้อ *N. gonorrhoeae* ภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อประเมินปริมาณเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งภายนอกและภายในแมคโครฟาจ เชื้อได้ถูกแยกจากการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนซ์ ดังแสดงในภาพที่ 13 ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ 2 ชนิด ได้แก่ สี Alexa-647 (พบติดสีแดงดังภาพที่ 13) และสี Alexa-488 (พบติดสีเขียวดังภาพที่ 13) โดยการติดสีแดงและสีเขียวแสดงถึงเชื้อที่อยู่บริเวณส่วนนอกของเซลล์แมคโครฟาจ (extracellular microorganisms) และสีเขียวแสดงถึงเชื้อที่อยู่บริเวณด้านในของเซลล์แมคโครฟาจ (intracellular microorganisms) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์บริเวณของนิวเคลียสด้วยสี DAPI (พบติดสีน้ำเงินดังภาพที่ 13) และบริเวณของไซโทพลาสซึมด้วยสี Alexa-568 (พบติดสีชมพูดังภาพที่ 13) เมื่อนำภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Fiji image หาค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหาปริมาณของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่อยู่ภายนอกและภายในเซลล์แมคโครฟาจ โดยพบว่าค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์ ในช่วงเวลาตั้งแต่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 24.74, 23.92, 25.64 และ 26.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ ตั้งแต่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.11, 3.62, 4.85 และ 5.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างเชื้อที่อยู่ภายนอกและภายในเซลล์ในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (** p -value = 0.000) และค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์ในช่วงเวลาที่ 6 และ 24 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* p -value = 0.038) โดยสามารถแสดงเป็นกราฟ Semi-logarithm (ภาพที่ 14) จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าเซลล์แมคโครฟาจเกิดการฟาโกไซโทซิสเชื้อ *N. gonorrhoeae* เข้าไปภายในเซลล์ ปริมาณของสีฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อบ่มผ่านไปเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้ภายในเซลล์แมคโครฟาจ แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้จะไม่ได้ยับยั้งกระบวนการฟาโกไซโทซิสในช่วงระยะต้นของการบ่ม แต่พบว่าปริมาณสีฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

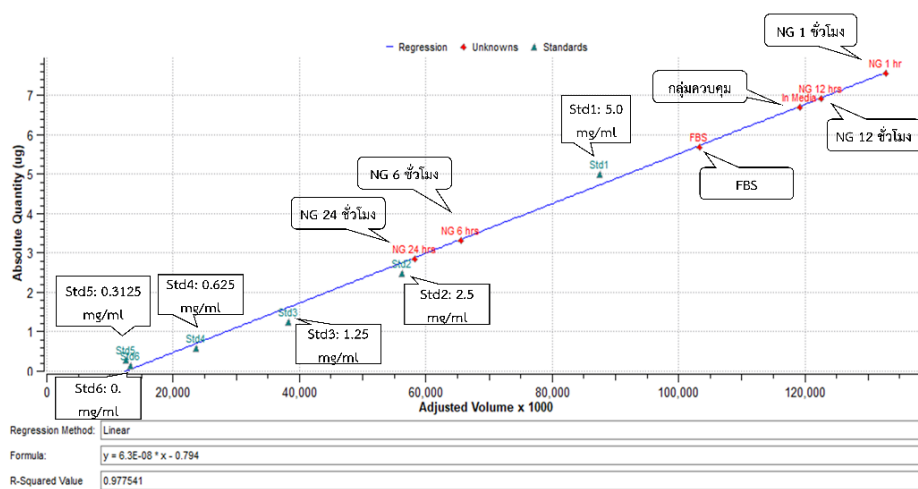
ภาพที่ 13 ภาพจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Deconvolution microscope ของเซลล์แมคโครฟาจที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ โดย 1) สียแดงและเหลือง แสดงถึงการติดสี Alexa-647 และ Alexa-488 ของเชื้อที่อยู่บริเวณภายนอกเซลล์ (extracellular) 2) สียเขียวแสดงถึงการติดสี Alexa-488 ของเชื้อที่อยู่บริเวณภายในเซลล์ (intracellular) 3) สียน้ำเงินแสดงถึงการติดสี DAPI ของนิวเคลียสของเซลล์แมคโครฟาจ และ 4) สียชมพู แสดงถึงการติดสี Alexa-568 ของไซโทพลาสซึมของเซลล์แมคโครฟาจ



ภาพที่ 14 กราฟ Semi-logarithm แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* บริเวณ Extra- และ Intra-cellular กับช่วงเวลาเปลี่ยนแปลงไปตั้งแต่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein quantification)

โปรตีนที่ได้จากการสกัด EVs ของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อบ่มกับเชื้อที่เวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เทียบกับตัวควบคุมที่เป็นเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้ทำการบ่มกับเชื้อ และ FBS เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Densitometry โดยตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE จากเครื่อง Typhoon FLA-3500 laser scanner (GE Biosciences) พบว่าตัวอย่างโปรตีน EVs ของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อบ่มกับเชื้อนาน 6 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนจำนวน 3.3 และ 2.7 ไมโครกรัมตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างโปรตีนจาก EVs ของเซลล์แมคโครฟาจที่ทำการบ่มกับเชื้อที่เวลา 1 และ 12 ชั่วโมง ของเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้ทำการบ่มกับเชื้อ (control) และของ FBS ไม่สามารถหาปริมาณโปรตีนที่แน่นอนได้ เนื่องจากปริมาณโปรตีนมีมากกว่าช่วงของโปรตีนมาตรฐานในกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 กราฟการหาปริมาณโปรตีนด้วยการสร้างกราฟมาตรฐาน BSA ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดจาก EVs ของเซลล์แมคโครฟาจที่ทำการบ่มกับเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (NG 1 ชั่วโมง) 6 ชั่วโมง (NG 6 ชั่วโมง) 12 ชั่วโมง (NG 12 ชั่วโมง) และ 24 ชั่วโมง (NG 24 ชั่วโมง) ของเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้ทำการบ่มกับเชื้อ (กลุ่มควบคุม) และของ FBS (FBS) โดย วิธี SDS-PAGE จากเครื่อง Typhoon FLA-3500 laser scanner (GE Biosciences)

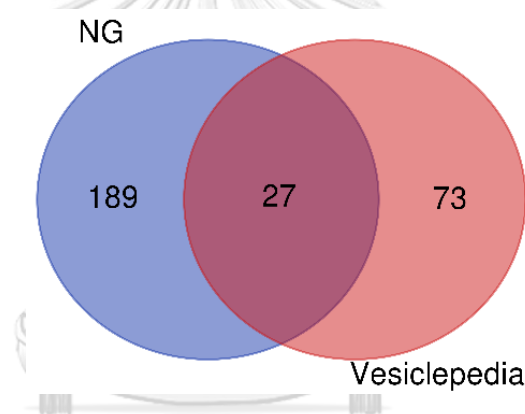
4.3 ผลการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ด้วยเทคนิค Tandem Mass spectrometry (LC MS/MS) และการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

โปรตีนที่ได้จากการสกัดจาก EVs ของเซลล์แมคโครฟาจที่ทำการบ่มกับเชื้อเป็นเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และตัวควบคุมที่เป็นเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้ทำการบ่มกับเชื้อ และ FBS นำมาประเมินปริมาณโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และเทคนิค Densitometry จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค STAGE-Tips และวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง QSTAR Elite Quadrupole-TOF mass spectrometry (Applied Biosystems, Sciex) ผลการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนของ EVs ด้วยเอนไซม์ทริปซิน และเครื่อง LC MS/MS เมื่อทำการจำแนกชนิดโปรตีนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของมนุษย์และโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยคัดแยกโปรตีนที่คล้ายกับโปรตีนใน FBS ออก

4.3.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs markers)

โปรตีนมนุษย์ทั้งหมดที่จำแนกได้จากโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs markers) จำนวน 100 ชนิด เป็นโปรตีนที่มีจำนวนการรายงานพบใน EVs มากที่สุด 100 อันดับแรก โดยทำการดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล Vesiclepedia (167) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลด้าน EVs ที่ได้รับความนิยมสูง ผลการเปรียบเทียบดังกล่าว

พบว่าโปรตีนมนุษย์ที่จำแนกได้ในการศึกษานี้เป็นโปรตีนจำเพาะของ EVs ทั้งหมด 27 ชนิด ได้แก่ ACTN4, CCT4, ANXA6, ANXA1, TLN1, FASN, FLOT1, SDCBP, KRT10, CAP1, EIF4A1, TPI1, YWHAQ, HSPA5, YWHAQ, PPIA, ACTN1, MYH9, TSG101, CCT3, SLC3A2, CLTC, ANXA11, FN1, BSG, YWHAZ และ PGK1 ดังภาพที่ 16 และตารางที่ 3 โดยในทั้งหมด 27 ชนิดนี้ มี 7 โปรตีน (26%) ที่เป็นโปรตีนจำเพาะของ EVs ที่มีการรายงานมากที่สุดใน 25 ลำดับแรก (Quartile 1) เมื่อทำการจัดโปรตีนจำเพาะออกเป็นกลุ่มตามบทความปริทัศน์ของ R. J. Simpson (168) ดังตารางที่ 3 พบว่าเป็นกลุ่มของ Cell structure and motility มากที่สุด จำนวน 6 ชนิด (22.22%) รองลงมา เป็นกลุ่มของ Trafficking and membrane fusion จำนวน 5 ชนิด (18.5%) กลุ่มของ Heat shock proteins and chaperones และ Signaling proteins กลุ่มละ 4 ชนิด (14.8%) และกลุ่มอื่นๆ ตามลำดับ จากผลการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจทั้งที่ไม่มีและที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* เกิดการหลั่ง EVs ออกมาภายนอกเซลล์ และ EVs ที่ได้ประกอบไปด้วยโปรตีนจำเพาะของ EVs ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นโครงสร้างและการทำหน้าที่ในการสื่อสารระหว่างเซลล์ของ EVs



ภาพที่ 16 แผนภาพ Venn diagram ระหว่างโปรตีนที่ได้ในการศึกษากับโปรตีนจำเพาะของ EVs จากฐานข้อมูล Vesiclepedia

ตารางที่ 3 โปรตีนจำเพาะของ EVs (EVs markers) ทั้งหมดจำนวน 27 ชนิด ที่แยกได้จาก EVs จากการศึกษานี้

Gene symbol	Protein name	Category
TLN1	Talin-1	Cell adhesion
MYH9	Myosin-9	Cell structure and motility
ACTN4	Alpha-actinin-4	Cell structure and motility
FN1	Fibronectin	Cell structure and motility
ACTN1	Alpha-actinin-1	Cell structure and motility
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	Cell structure and motility

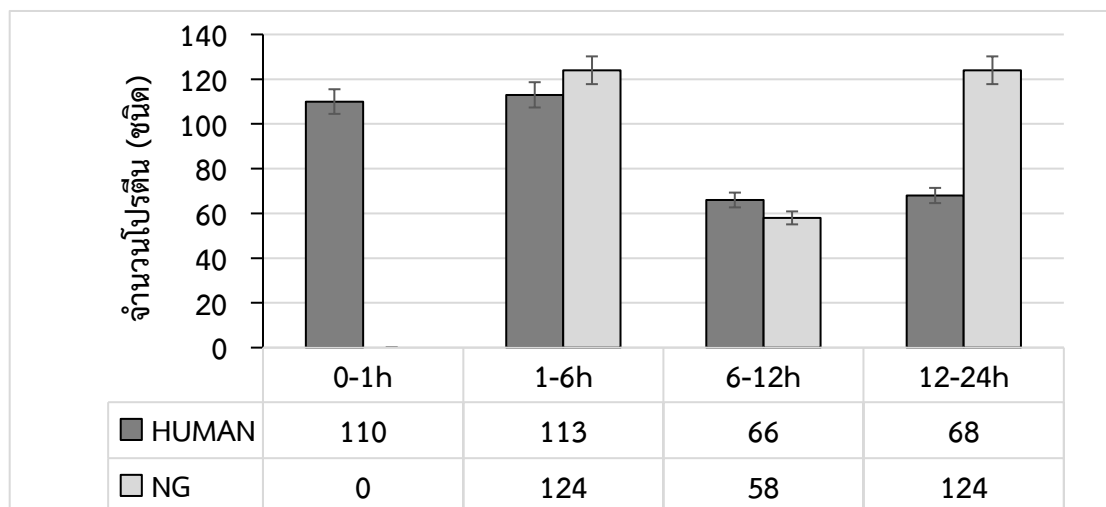
Gene symbol	Protein name	Category
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	Cell structure and motility
BSG	Basigin	ECM remodeling
PPIA*	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Heat shock proteins and chaperones
CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	Heat shock proteins and chaperones
CCT3	T-complex protein 1 subunit gamma	Heat shock proteins and chaperones
HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	Heat shock proteins and chaperones
SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Membrane protein
PGK1*	Phosphoglycerate kinase 1	Metabolic enzymes
TPI1*	Triosephosphate isomerase	Metabolic enzymes
FASN	Fatty acid synthase	Metabolic enzymes
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein	MVB biogenesis
YWHAZ*	14-3-3 protein zeta/delta	Signaling proteins
YWHAE*	14-3-3 protein epsilon	Signaling proteins
SDCBP*	Syntenin-1	Signaling proteins
YWHAQ	14-3-3 protein theta	Signaling proteins
CLTC*	Clathrin heavy chain 1	Trafficking and membrane fusion
ANXA6	Annexin A6	Trafficking and membrane fusion
FLOT1	Flotillin-1	Trafficking and membrane fusion
ANXA1	Annexin A1	Trafficking and membrane fusion
ANXA11	Annexin A11	Trafficking and membrane fusion
EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	Transcription and protein synthesis

Gene symbol* โปรตีนจำเพาะของ EVs ที่มีการรายงานมากที่สุด 25 ลำดับแรก (Quartile 1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนของมนุษย์และเชื้อ *N. gonorrhoeae*

จำแนกชนิดโปรตีนของมนุษย์และเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในแต่ละช่วงเวลา โดยเรียงลำดับช่วงเวลาที่ยาแนกชนิดของโปรตีนได้มากที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 113 ชนิด ลำดับถัดมา คือ ตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 และ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 110 68 และ 66 ชนิด ตามลำดับ และโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถจำแนกตามช่วงเวลาโดยเรียงลำดับช่วงเวลาที่ยาแนกชนิดของโปรตีนได้มากที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เท่ากันที่ 124 ชนิด รองลงมา คือ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เท่ากับ 58 ชนิด โดย ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ไม่พบโปรตีนที่สามารถจำแนกชนิดได้ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจำนวนชนิดของโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงผลการจำแนกโปรตีนได้ ภาพที่ 17



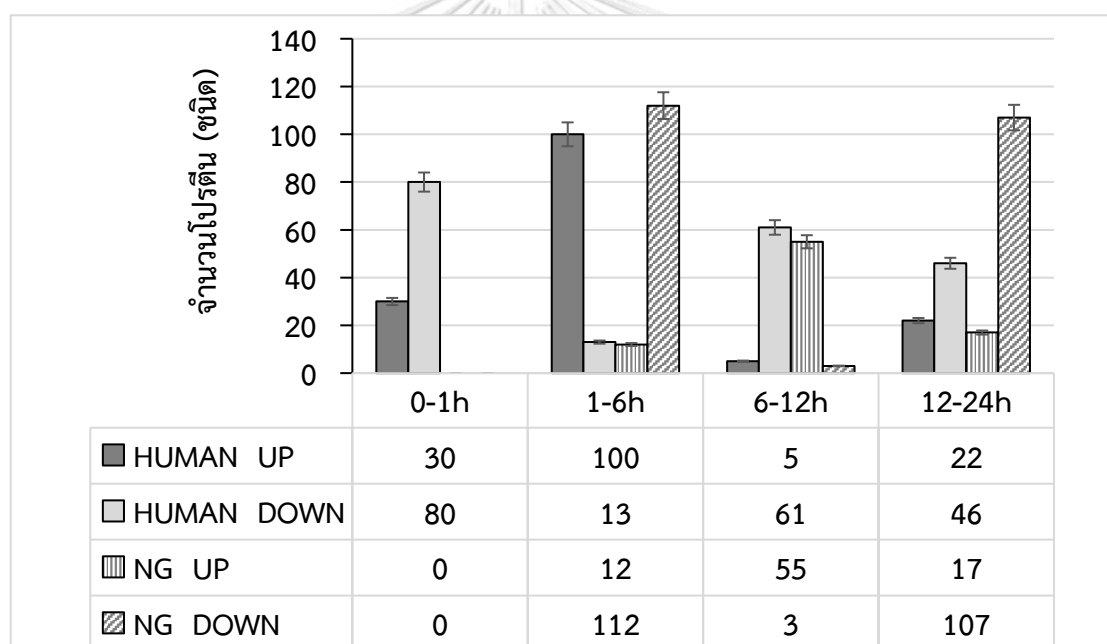
ภาพที่ 17 จำนวนโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกภายใน EVs ที่ช่วงเวลาต่างๆ

4.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry

ผลของเปปไทด์เมื่อย่อยโปรตีนของ EVs ด้วยเอนไซม์ทริปซิน และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS เมื่อจำแนกชนิดโปรตีนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ โดยเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของมนุษย์และเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งนี้ได้แยกโปรตีนที่คล้ายกับโปรตีนใน FBS ออกและวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry ทำให้บ่งชี้ถึงการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) ได้ ดังภาพที่ 18 โดยพบว่าโปรตีนของมนุษย์ มีจำนวนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุดในตัวอย่างชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 113 ชนิด โดยมีโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 100 ชนิด (88.5%) และการแสดงออกที่ลดลงเพียง 13 ชนิด (11.5%) ซึ่งจัดเป็นสัดส่วนของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุดและโปรตีนที่ลดการแสดงออกน้อยที่สุดจากตัวอย่างทดสอบทั้งสี่ช่วงเวลา ในทางกลับกันของช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ที่พบโปรตีนทั้งหมดน้อยที่สุดจำนวน 66 ชนิด พบโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเพียง 5 ชนิด (7.6%) ซึ่งเป็นสัดส่วนน้อยที่สุดของตัวอย่างทั้งหมด แต่กลับพบโปรตีนที่ลดการแสดงออกมากถึง 61 ชนิด (92.4%) เป็นสัดส่วนมากที่สุดของทุกช่วงเวลาทดสอบ ส่วนในช่วงเวลาเริ่มต้น ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีปริมาณโปรตีนที่แสดงออกลดลงมากกว่าโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณนี้สามารถให้รายละเอียดถึงการแสดงออกของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กันในแต่ละช่วงเวลาที่น่าสนใจในช่วงต้นของการติดเชื้อและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แมคโครฟาจที่พบการแสดงออกของโปรตีนสูงขึ้นและลดลงในช่วงเวลาต่อมา

หากพิจารณาผลการแสดงออกของโปรตีนจากเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เพิ่มขึ้นและลดลง กลับให้ผลตรงกันข้ามกับโปรตีนจากเซลล์แมคโครฟาจ (มนุษย์) ในช่วงเริ่มต้นถึงช่วงเวลาที 6 <-> 12 พบโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการติดเชื้อที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 12 ชนิด (9.7%) จากทั้งหมด 124 ชนิด ซึ่งเป็นสัดส่วนน้อยที่สุดจากทุกตัวอย่าง และพบโปรตีนที่แสดงออกลดลงมากถึง 112 ชนิด (90.3%) จัดเป็นสัดส่วนมากที่สุดเช่นกัน ในขณะที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 กลับพบจำนวนโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 55 ชนิด (94.8%) จากจำนวนโปรตีนทั้งหมด 58 ชนิด และพบเพียง 3 ชนิด (5.2%) ที่แสดงออกลดลง อย่างไรก็ตามในชั่วโมงต่อมาที่ 12 <-> 24 นั้นพบว่าโปรตีนส่วนมากมีการแสดงออกลดลง 107 ชนิด (86.3%) และแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงจำนวน 17 ชนิด (13.7%)

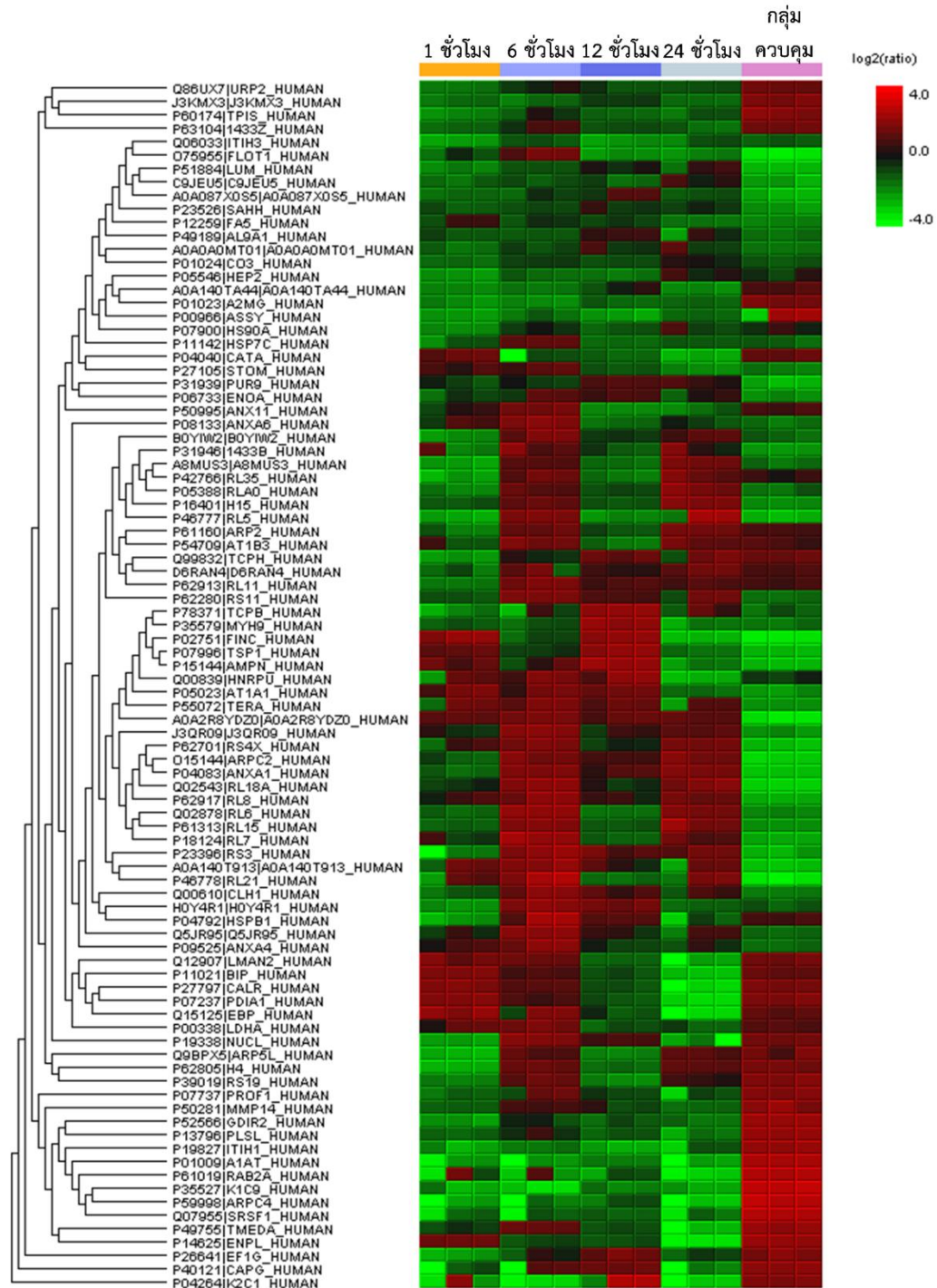
จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่างจำนวนชนิดของโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงพบว่าจำนวนชนิดของโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 18 จำนวนโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) ภายใน EVs ที่ช่วงเวลาต่างๆ

จากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry เมื่อนำข้อมูล Log₂ ratio ของการแสดงออกของโปรตีนทั้งโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงและเพิ่มขึ้นในแต่ละเวลาทำการสร้างกราฟ heat map จะได้กราฟออกมาดังภาพที่ 19 โดยกราฟ heat map จะทำให้เห็นภาพรวมการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดทั้งโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) โดยค่า Log₂ ratio แทนด้วยระดับของสี จากค่าระดับการแสดงออกต่ำสุดสีเขียว (Log₂ ratio = -4) จนถึงค่าระดับการแสดงออกสูงสุดสีแดง

(Log₂ ratio = 4) โดยจะเห็นว่าระดับการแสดงของออกของโปรตีนมีความหลากหลายในแต่ละช่วงเวลา ทั้งส่วนของโปรตีนที่มีการแสดงออกเหมือนกันและจำเพาะกับแต่ละช่วงเวลา ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ถึงจำนวนและชนิดของโปรตีนดังกล่าวต่อไป



ภาพที่ 19 แผนภาพ Heat map แสดงตัวอย่างการแสดงออกของโปรตีนของมนุษย์ที่ช่วงเวลาต่างๆ จำนวน 128 ชนิด โดยสีแสดงถึงระดับการแสดงออกของโปรตีน (Log₂ ratio) จากค่าระดับการแสดงออกต่ำสุดสีเขียว (Log₂ ratio = -4) จนถึงค่าระดับการแสดงออกสูงสุดสีแดง (Log₂ ratio = 4)

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนมนุษย์ (Human protein)

ผลการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้เพื่อจำแนกชนิดโปรตีนของมนุษย์และเชื้อ *N. gonorrhoeae* ตามเวลาที่กำหนด และทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) ในโปรตีนของมนุษย์ ผลการวิเคราะห์นำมาสร้างแผนภาพ Venn diagram เพื่อแสดงจำนวนของโปรตีนที่พบการแสดงออกในช่วงเวลาต่างๆ

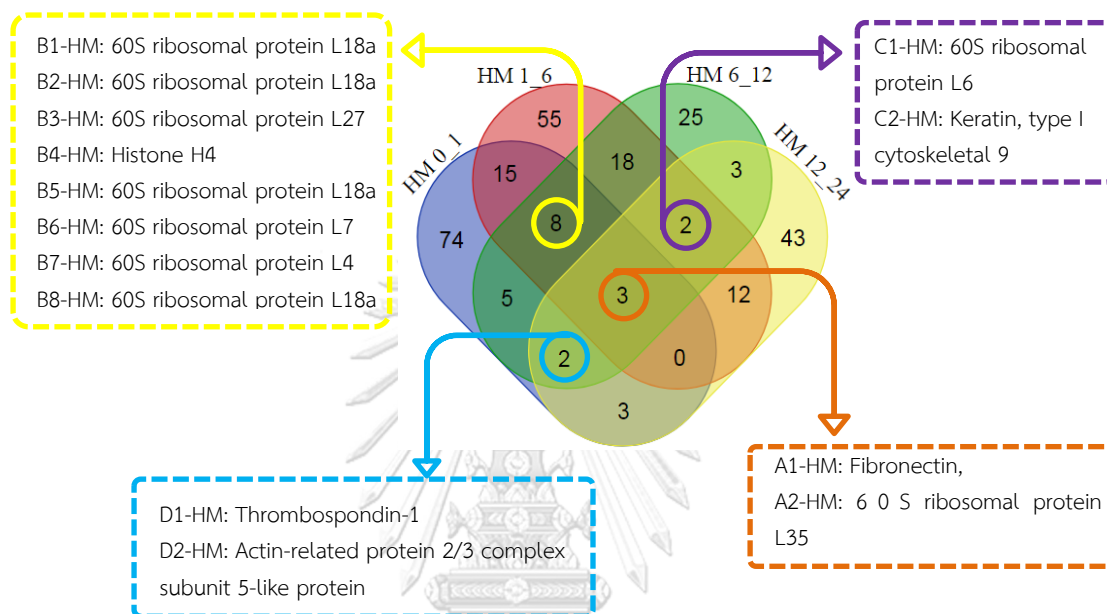
4.5.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram

เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนของมนุษย์ทั้งหมดด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram (ภาพที่ 20) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิด ในช่วงเวลาทดสอบ โดยพบว่ามีโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ Fibronectin, 60S ribosomal protein L35 และ 40S ribosomal protein S19 ที่พบการแสดงออกได้ทุกช่วงเวลาทดสอบ (A1-HM ถึง A3-HM) จากจำนวนโปรตีนทั้งหมดในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 1 ที่พบมากถึง 110 ชนิด มีจำนวน 74 ชนิด (67.3%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้เท่านั้น จำนวน 23 ชนิด (21%) ที่พบได้สองช่วงเวลาร่วมกัน คือ ร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 15 ชนิด ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 5 ชนิด และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ชนิด พบโปรตีนที่แสดงออกร่วมกันสามช่วงเวลา 10 ชนิด (9%) โดยพบร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 8 ชนิด (B1-HM ถึง B8-HM) พบร่วมกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 2 ชนิด (D1-HM และ D2-HM) และไม่พบโปรตีนร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24

ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบโปรตีนจำนวนมากที่สุดถึง 113 ชนิด ซึ่งมีจำนวน 55 ชนิด (48.7%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้เท่านั้น มีโปรตีนที่คาบเกี่ยวกับช่วงเวลาอื่นสองช่วงเวลา จำนวน 45 ชนิด (40%) นอกเหนือจากที่พบร่วมกับชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 15 ชนิด ยังพบร่วมกับ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 18 ชนิด และร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 12 ชนิด ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกร่วมกัน 3 ช่วงเวลา ดังผลที่แสดงไปในข้างต้น สำหรับช่วงเวลานี้มีโปรตีนที่แสดงออกร่วมกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 2 ชนิด (C1-HM และ C2-HM)

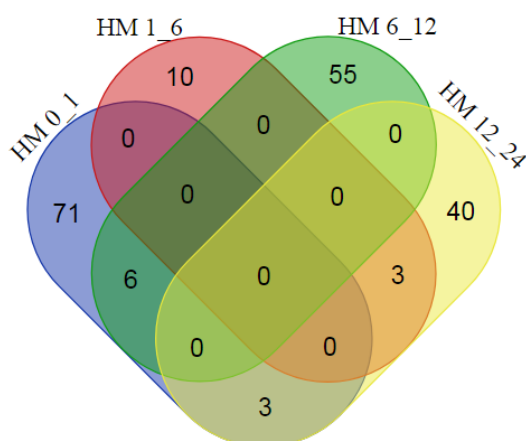
ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบโปรตีนจำนวนน้อยที่สุด 66 ชนิด ซึ่งมีจำนวน 25 ชนิด (37.9%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้เท่านั้น มีโปรตีนที่คาบเกี่ยวกับช่วงเวลาอื่นสองช่วงเวลา จำนวน 26 ชนิด (39.4%) นอกเหนือจากที่พบร่วมกับชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 5 และ 18 ชนิดตามลำดับ ยังพบร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ชนิด ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกร่วมกัน 3 ช่วงเวลา จำนวน 12 ชนิด (18.2%) ดังผลที่แสดงไปในเวลาที่ 0 <-> 1 (B1-HM ถึง B8-HM D1-HM และ D2-HM) และ 1-6 (C1-HM และ C2-HM)

ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 12-24 พบโปรตีนจำนวนใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 68 ชนิด ซึ่งมีจำนวนถึง 43 ชนิด (70.6%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้เท่านั้น มีโปรตีนที่คาบเกี่ยวกับช่วงเวลาอื่นสองช่วงเวลาจำนวน 18 ชนิด (26.5%) และโปรตีนที่แสดงออกพร้อมกันสามช่วงเวลา (B1-HM ถึง B8-HM C1-HM และ C2-HM) มีจำนวนเพียง 4 ชนิด (5.9%) ตามรายละเอียดที่ได้แสดงข้างต้น



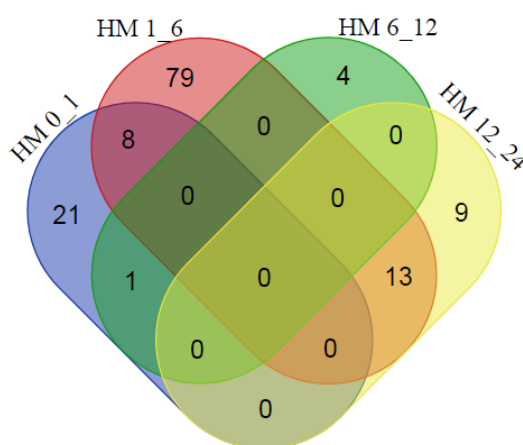
ภาพที่ 20 แผนภาพ Venn-diagram แสดงจำนวนของโปรตีนมนุษย์ใน EVs ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลาต่างๆ และรายละเอียดของโปรตีนพบการแสดงออกพร้อมกันในช่วงเวลาที่ 0 <-> 1, 1 <-> 6 และ 6 <-> 12 ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6, 6 <-> 12 และ 12 <-> 24 ช่วงเวลาที่ 0 <-> 1, 6 <-> 12 และ 12 <-> 24 และช่วงเวลาที่ 0 <-> 1, 1 <-> 6, 6 <-> 12 และ 12 <-> 24

เมื่อนำโปรตีนของมนุษย์มาวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry พบว่ากลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง (down regulation) ของแต่ละช่วงเวลาทดสอบมีสองรูปแบบ คือ พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นกับพบได้ในสองช่วงเวลาทดสอบ ที่สัดส่วนมากกว่า 75% จะมีการแสดงออกลดลงในช่วงเวลาทดสอบอย่างจำเพาะ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบ 71 ชนิด (88.7%) จากโปรตีนที่แสดงออกลดลงในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 80 ชนิด ในชั่วโมงถัดมาที่ 1 <-> 6 พบ 10 ชนิด (76.9%) จากโปรตีนที่แสดงออกลดลงในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 13 ชนิด ต่อมาชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบสูงถึง 55 ชนิด (90.2%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 61 ชนิด และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบ 40 ชนิด (87%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 46 ชนิด ในขณะที่มีโปรตีนบางชนิดที่แสดงออกลดลงมากกว่าช่วงเวลาเดียว เช่น ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบโปรตีนร่วมกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 6 ชนิด และร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ชนิด และ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 หรือในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ชนิด (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนมนุษย์ที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ

เช่นเดียวกันกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up regulation) ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบนั้น พบแสดงออกสองรูปแบบเช่นกัน ซึ่งมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนที่แสดงออก ณ ช่วงเวลานั้นโดยเฉพาะ ได้แก่ ชั่วโมงที่ 0 \leftrightarrow 1 พบ 21 ชนิด (70%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 30 ชนิด ในชั่วโมงที่ 1 \leftrightarrow 6 พบจำนวน 79 ชนิด (79%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 100 ชนิด และชั่วโมงที่ 6 \leftrightarrow 12 พบจำนวน 4 ชนิด (80.9%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 5 ชนิด ยกเว้นในตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 \leftrightarrow 24 พบเพียง 9 ชนิด (40.9%) จากโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้นทั้งหมด 22 ชนิด ทั้งนี้พบว่าโปรตีนบางชนิดยังคงแสดงออกเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในช่วงเวลาต่อมา โดยพบโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 8 ชนิดที่พบทั้งในชั่วโมงที่ 0 \leftrightarrow 1 และ ชั่วโมงที่ 1 \leftrightarrow 6 มีเพียงชนิดเดียวที่พบทั้งในชั่วโมงที่ 0 \leftrightarrow 1 และ ชั่วโมงที่ 6 \leftrightarrow 12 นอกจากนี้ยังพบอีก 13 ชนิดที่แสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในชั่วโมงที่ 1 \leftrightarrow 6 และ ชั่วโมงที่ 12 \leftrightarrow 24 ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนมนุษย์ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ

4.5.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ (Gene ontology : GO analysis)

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนมนุษย์ทั้งหมดที่แยกได้จาก EVs หลังจากวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล PANTHER (protein analysis through evolutionary relationships) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลด้านชีวภาพขนาดใหญ่รวบรวมข้อมูลของยีน โปรตีน และหน้าที่สำคัญ ทำให้ได้ผลของ Gene ontology หรือ GO analysis โดยจำแนกยีนทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ (protein-encode gene) ดังนี้ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) จำนวน 319 ยีน ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) จำนวน 434 ยีน ซึ่งเป็นช่วงที่พบยีนที่แสดงออกมากที่สุด แต่เมื่อบ่มเซลล์ที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อเนื่องพบจำนวนยีนที่แสดงออกลดลงเกือบเท่าตัว ดังแสดงในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) จำนวน 205 ยีน และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24) จำนวน 225 ยีน ทั้งนี้เมื่อเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีนตามคุณสมบัติ ทั้ง 5 ด้าน ได้แก่ องค์ประกอบของเซลล์ (Cellular component: CC) กระบวนการทางชีวภาพ (Biological process: BP) หน้าที่ของเซลล์ในระดับโมเลกุล (Molecular function: MF) กลุ่มของโปรตีน (Protein class: PC) และวิถีของเซลล์ (Pathway: PW) แม้ว่าสัดส่วนของแต่ละคุณสมบัติมีความใกล้เคียงกัน มีผลที่น่าสนใจว่ากลุ่มยีนที่พบมากที่สุดในทุกช่วงเวลาทดสอบจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ (BP) ซึ่งมีจำนวนถึง 1 ใน 3 ของยีนที่พบในแต่ละช่วงเวลา ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของเซลล์มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา ยกเว้นชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ที่พบมากกว่าช่วงเวลาอื่น กลุ่มของโปรตีน (PC) พบลดลงแปรตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) และวิถี (PW) มีลักษณะการเพิ่มขึ้นและลดลงตรงข้ามกันในแต่ละช่วงเวลา กล่าวคือ เมื่อเวลาดำเนิน จากชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ไปยังชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุลมีเปอร์เซ็นต์ลดลงแต่ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น จนสิ้นสุดการทดสอบ (ภาพที่ 23)

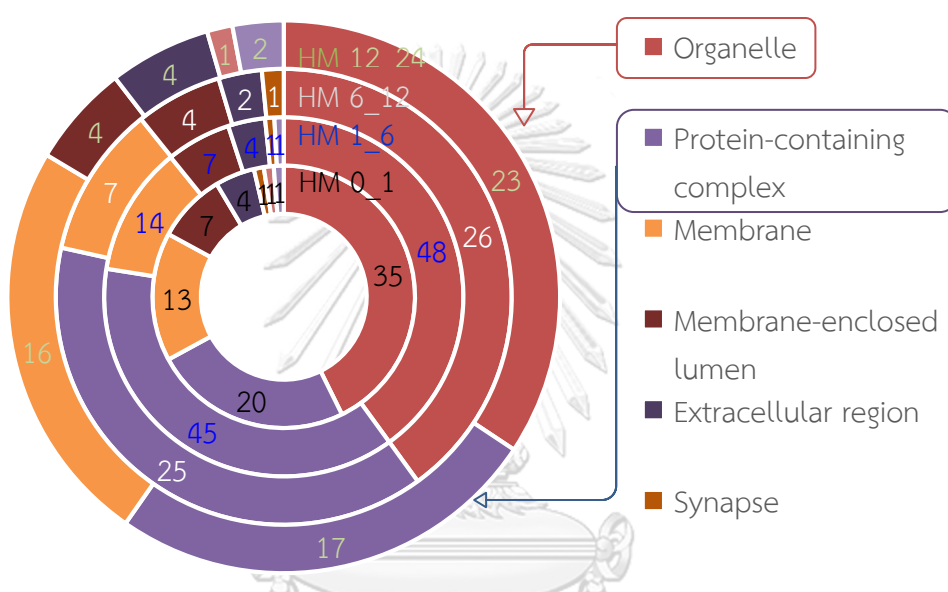


ภาพที่ 23 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24) โดยจำแนกตามคุณสมบัติทั้ง 5 ประการ ได้แก่ CC (Cellular component), BP (Biological process), MF (Molecular function), PC (Protein class) และ PW (Pathway)

เมื่อพิจารณาแยกส่วนในแต่ละคุณสมบัติทั้ง 5 ด้าน **องค์ประกอบของเซลล์ (CC)** มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ แบ่งตามโครงสร้างโดยรอบเซลล์และองค์ประกอบภายในเซลล์ ดังนี้ organelle, protein-containing complex, membrane, Membrane-enclosed lumen, extracellular region, synapse, cell junction และ supramolecular complex ซึ่งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างเหล่านี้มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบ โดยพบสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 120 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 82 ยีน และเมื่อติดตามตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์ติดเชื้อแล้วพบว่า มีจำนวนยีนใกล้เคียงกัน คือ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 65 และ 67 ยีนตามลำดับ

เมื่อพิจารณาแต่ละองค์ประกอบพบว่าส่วนออร์แกเนลล์พบมากที่สุดในทุกช่วงเวลาทดสอบโดยเฉลี่ย 39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในช่วงเวลาทดสอบนั้น ที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบถึง 35 ยีน (42.7%) จากยีนทั้งหมดที่พบ 82 ยีนในช่วงเวลาทดสอบนั้น ในขณะที่ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนเท่ากันคือ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบเพียง 23 ยีน ซึ่งมีจำนวนยีนน้อยกว่าครึ่งของช่วงเวลาที่ยีนพบสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาเป็นสัดส่วนกับยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง ณ ช่วงเวลาเดียวกันพบว่าลดลงเล็กน้อย (34.3%) ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มของโปรตีนที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (protein-containing complex) ถูกพบรองจากออร์แกเนลล์ โดยเฉลี่ย 31 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบในสัดส่วน 37.5 เปอร์เซ็นต์ และ 38.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนของยีนที่เกี่ยวข้องกับออร์แกเนลล์ หากพิจารณาเฉพาะสองช่วงเวลานี้พบว่าสัดส่วนของโปรตีนสองกลุ่มนี้มียีนที่แสดงออก

มากกว่า 3 ใน 4 ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มียีนทั้งออร์แกเนลล์และ protein-containing complex ทั้งสองชุดลดลงเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบส่วนที่อยู่ในช่องว่างของเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ทั้ง Membrane, Membrane-enclosed lumen และ Extracellular region มากกว่าช่วงเวลาอื่น คิดเป็น 35.8 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1 ใน 3 ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ มียีนบางกลุ่มที่พบสัดส่วนเล็กน้อยในทุกช่วงเวลา ได้แก่ องค์ประกอบของโครงสร้างที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ (Cell junction) กระจับการไซแนป (Synapse) และ Supramolecular complex เช่น ไฟเบอร์ (ภาพที่ 24)

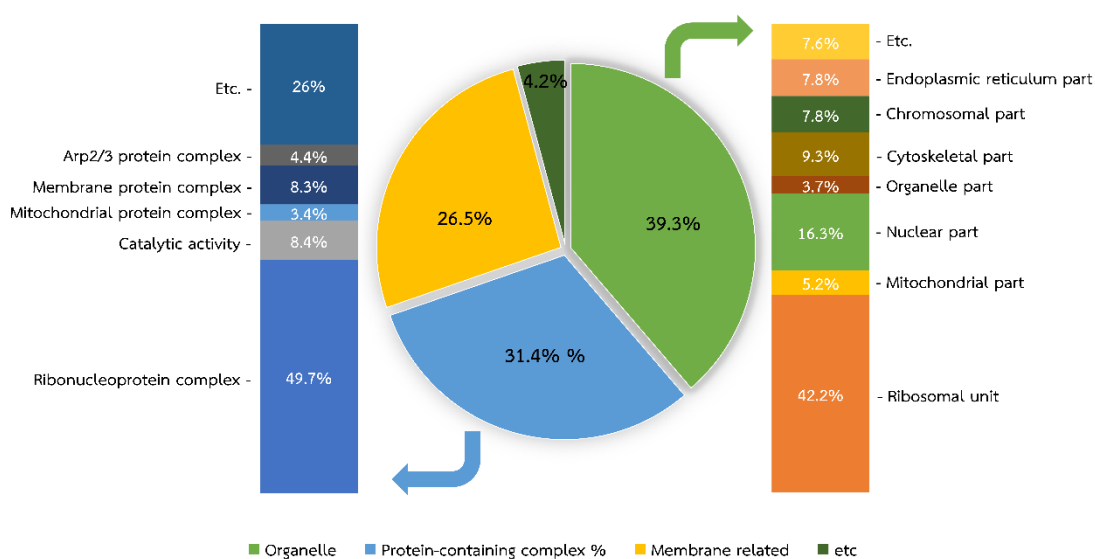


ภาพที่ 24 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์จำนวน 334 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24)

ด้วยสัดส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับออร์แกเนลล์ได้ถูกพบมากที่สุด (ค่าเฉลี่ย 39.3%) ในกลุ่มยีน CC ทำให้มีการวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของออร์แกเนลล์ ได้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับ ribosomal subunit ถูกพบมากที่สุดโดยเฉลี่ย (42.2%) พบสูงสุดในช่วงเวลาเดียวกัน คือ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึง 16 ยีน (55.2%) จาก 29 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับออร์แกเนลล์ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลานี้ มีสัดส่วนใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนถึง 24 ยีน (52.2%) จากทั้งหมด 46 ยีนของออร์แกเนลล์ เป็นที่น่าสังเกตว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรียพบจำนวนมากที่สุดในช่วงเวลาดำเนินคือชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ถึง 6 ยีน และลดลงเหลือเพียงยีนเดียวในช่วงเวลาต่อมาที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 คล้ายกับที่พบยีนส่วนของ organelle envelop ที่พบ 4 ยีนในช่วงเริ่มต้น และลดลงเหลือเพียง 1 ยีนในเวลาต่อมา หลังจากนั้นไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องนี้เลย ส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับนิวเคลียส (nuclear part) พบการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกช่วงเวลา โดยมีสัดส่วนใกล้เคียงกันประมาณ

18 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นของการติดเชื้อที่เซลล์แมคโครฟาจแสดงออกน้อยกว่าช่วงเวลาอื่น (12.5%) ซึ่งสอดคล้องกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมที่มีการแสดงออกจำนวน 2 ยีนอย่างคงที่ในทุกช่วงเวลา และเพิ่มเป็น 3 ยีนในช่วงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ยังมียีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับส่วน cytoskeletal และ endoplasmic reticulum ที่มีการแสดงออกในทุกช่วงเวลา ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับส่วน cytoplasmic vesicle พบเพียง 2 ยีนในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ต่อเนื่องถึง 6 <-> 12

เมื่อพิจารณาเฉพาะส่วนโปรตีนที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (protein-containing complex) ซึ่งพบรองลงมาจากยีนออร์แกเนลล์ พบส่วนที่เกี่ยวข้องกับ ribonucleoprotein complex โดยเฉลี่ย 49.7 เปอร์เซ็นต์ พบสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ หรือ 18 ยีน จากทั้งหมด 30 ยีน ในช่วงเวลานี้ และพบถึงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่เริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 1 <-> 6 แต่พบว่าเมื่อชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนลดลงเกือบเท่าตัวเหลือ 32 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับที่พบในส่วนออร์แกเนลล์ที่พบยีนเกี่ยวข้องกับส่วนไมโทคอนเดรียเฉพาะในชั่วโมงแรกที่ 0 <-> 1 เท่านั้น จำนวน 3 ยีน ยังพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ catalytic complex, membrane protein complex และ Arp2/3 protein complex ที่พบได้ทุกช่วงเวลาในจำนวนไม่มาก ดัชนีส่วนค่าเฉลี่ยที่แสดงในกราฟแท่ง ภาพที่ 25

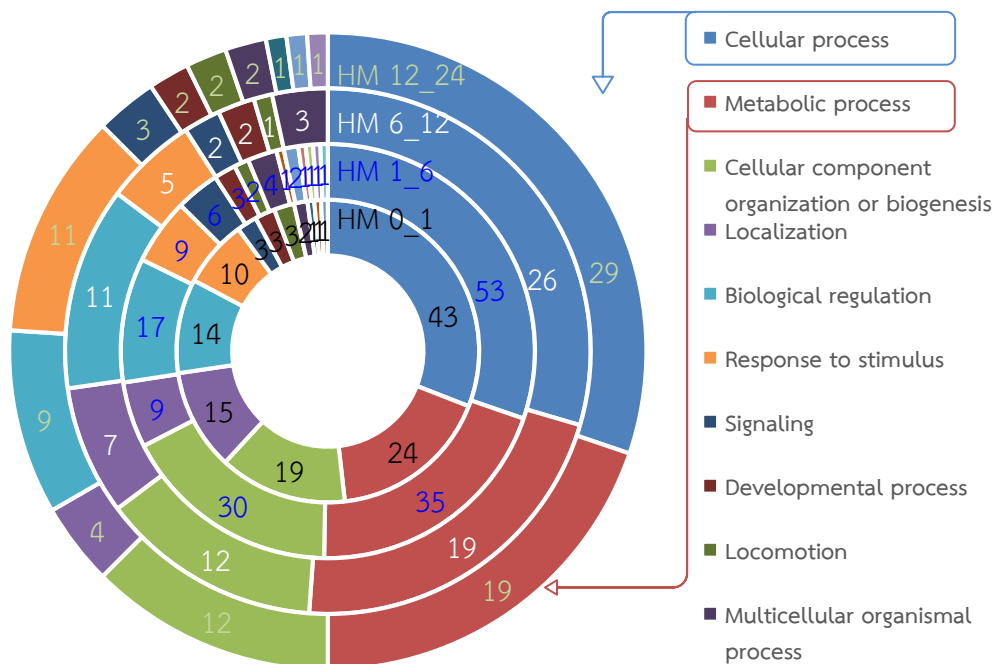


ภาพที่ 25 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) (กราฟวงกลม) และข้อมูลสัดส่วนที่พบมากของยีนที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของออร์แกเนลล์ (กราฟแท่งด้านขวา) กับข้อมูลสัดส่วนที่สำคัญของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (protein-containing complex) (กราฟแท่งด้านซ้าย) โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24

คุณสมบัติด้าน **กระบวนการชีวภาพ (BP)** มีโปรตีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพต่างๆ หลายกระบวนการ อาทิเช่น cellular process, metabolic process, cellular component organization หรือ biogenesis, localization, biological regulation, response to stimulus และ signaling โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพต่างๆ เหล่านี้มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบ แต่มีลำดับเช่นเดียวกับการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) โดยพบสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 175 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 139 ยีน และเมื่อติดตามตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์ติดเชื้อแล้วพบว่ามีจำนวนยีนลดลงเกือบสองเท่า โดยชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เหลือเพียงจำนวน 88 ยีน และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 96 ยีนตามลำดับ

เมื่อพิจารณาแต่ละกระบวนการชีวภาพพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการในระดับเซลล์ (cellular process) มากที่สุดในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 30.32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในกระบวนการชีวภาพนั้น โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดเมื่อชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวนถึง 53 ยีน (30.29%) จากยีนทั้งหมด 175 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น ในขณะที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 43 ยีน แม้ว่าในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จะมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวของช่วงเวลาที่พบสูงสุด โดยพบยีนจำนวน 26 และ 29 ยีน ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาเป็นสัดส่วนกับยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง ณ ช่วงเวลาเดียวกันพบว่าสัดส่วนในแต่ละช่วงเวลามีค่าแตกต่างกันน้อยมาก ในส่วนของกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism process) ได้ถูกพบรองลงมาจากกระบวนการในระดับเซลล์ พบเฉลี่ย 19.48 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนมากที่สุดจำนวน 35 ยีน (20.0%) ในขณะที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 24 ยีน แม้ว่าในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จะมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวของช่วงเวลาที่พบสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยพบยีนจำนวน 19 ยีนเท่ากัน แต่กลับพบสัดส่วนเมื่อเทียบกับยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง ณ ช่วงเวลาเดียวกัน มีสัดส่วนในแต่ละช่วงเวลามีค่าแตกต่างกันน้อยมาก กระบวนการที่ถูกพบลำดับต่อมาเป็นกระบวนการ cellular component organization หรือ biogenesis โดยมีค่าเฉลี่ย 14.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนมากที่สุด 30 ยีน (17.14%) ในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 19 ยีน แม้ว่าในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จะมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวของช่วงเวลาที่พบสูงสุด โดยพบยีนจำนวน 12 ยีนเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาเป็นสัดส่วนกับยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง ณ ช่วงเวลาเดียวกันพบว่าสัดส่วนในแต่ละช่วงเวลามีค่าแตกต่างกันน้อยมาก เป็นที่น่าสังเกตว่ากระบวนการข้างต้นทั้งสามมีลำดับการเพิ่มและลดของยีนตามช่วงเวลาการทดสอบในลักษณะเดียวกัน โดยมีจำนวนยีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และ 12 <-> 24 แต่เมื่อพิจารณาเป็นสัดส่วนกับยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง ณ ช่วงเวลาเดียวกันพบว่าแตกต่างกันน้อยมาก กระบวนการที่ถูกพบลำดับรองลงมา คือ กระบวนการ biological regulation โดยเฉลี่ย 10.24 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนมากที่สุดจำนวน 17 ยีน (9.71%) ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนยีนที่พบในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ที่พบจำนวน 14 ยีน ภายหลังจากชั่วโมงที่ 6 จำนวนยีนที่พบมีจำนวนลดลง โดยจำนวนยีนที่พบในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยพบจำนวน 11 และ 9 ยีนตามลำดับ กระบวนการที่พบรองถัดลงมาเป็นกระบวนการ localization และ response to stimulus โดย

ค่าเฉลี่ยเท่ากันเท่ากับ 7.03 เปอร์เซนต์ แต่จำนวนยีนที่พบมากน้อยแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ โดยกระบวนการ localization พบจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 15 ยีน และพบจำนวนยีนลดลงตามช่วงเวลาของการทดสอบที่ดำเนินไป โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 9, 7 และ 4 ยีน ตามลำดับ กระบวนการ response to stimulus พบจำนวนยีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 11 ยีน แต่จำนวนยีนที่พบมีจำนวนใกล้เคียงกับช่วงเริ่มต้นของการทดสอบ โดยที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนเท่ากับ 10 และ 9 ตามลำดับ โดยมีเพียงเฉพาะชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เท่านั้นที่มีจำนวนยีนลดลงกว่าครั้งหนึ่ง โดยพบจำนวนยีนเท่ากับ 5 ยีน ลำดับรองลงมาเป็นกระบวนการ signaling, developmental process, locomotion และ multicellular organismal process โดยทั้ง 4 กระบวนการนี้มีการแสดงออกของยีนสม่ำเสมอทุกช่วงเวลา โดยมีจำนวนยีนที่แสดงออกไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังมียีนบางกลุ่มที่พบจำนวนน้อยในแต่ละช่วงเวลา แต่พบว่ามีความน่าสนใจ ได้แก่ กระบวนการ immune system process โดยพบการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 1, 2 และ 1 ยีนตามลำดับ และกระบวนการ biological adhesion ที่พบการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ช่วงเวลาละ 1 ยีน ดังภาพที่ 26

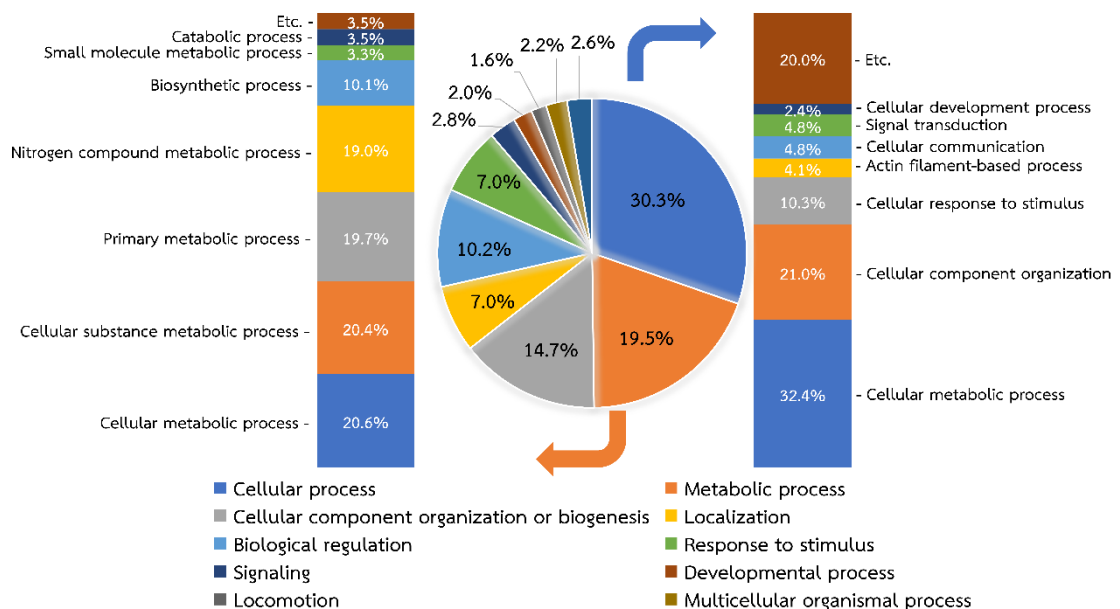


ภาพที่ 26 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ จำนวน 498 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24)

ด้วยสัดส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในระดับเซลล์ (cellular process) มากที่สุด (ด้วยค่าเฉลี่ย 30.32%) ในกลุ่มยีน BP ทำให้มีการวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของกระบวนการในระดับเซลล์ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในระดับเซลล์มากที่สุด โดยเฉลี่ย 32.41 เปอร์เซ็นต์ พบสูงที่สุดในช่วงเวลาเดียวกับคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ คือ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 34 ยีน (32.38%) จาก 105 ยีน ที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการในระดับเซลล์ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลานี้ ในขณะที่ช่วงเวลาอื่นยีนที่พบมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 24 ยีน (30.94%) จากทั้งหมด 80 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการในระดับเซลล์ทั้งหมดในช่วงเวลานี้ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 18 ยีน (42.86%) จากทั้งหมด 42 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการในระดับเซลล์ทั้งหมดในช่วงเวลานี้ และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 18 ยีน (28.57%) จากทั้งหมด 63 ยีน แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการในระดับเซลล์ทั้งหมดในช่วงเวลานี้ แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนพบว่าชั่วโมงที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนสูงสุดและมีค่าแตกต่างจากช่วงเวลาอื่นค่อนข้างสูงในขณะที่ช่วงเวลาอื่นๆ มีสัดส่วนแตกต่างกันไม่มาก กระบวนการ cellular component organization ถูกพบรองลงมาโดยเฉลี่ย 21.03 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าช่วงแรกของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 มีการแสดงออกสูงสุด จำนวน 25 ยีน (23.81%) และมีสัดส่วนใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 17 ยีน (21.25%) แต่หลังเวลาการทดสอบชั่วโมงที่ 6 จำนวนยีนที่พบมีจำนวนลดลงและมีสัดส่วนใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวนยีน 8 ยีน (19.05%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 11 ยีน (17.46%) กระบวนการ cellular response to stimulus ถูกพบรองลงมา โดยเฉลี่ย 10.34 เปอร์เซ็นต์ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีจำนวนยีนที่แสดงออกใกล้เคียงกัน จำนวน 8, 9 และ 9 ยีน ตามลำดับ มีเพียงชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เท่านั้นที่มีจำนวนยีนที่แสดงออกต่ำ จำนวน 4 ยีน รองลงมาเป็นกระบวนการ cell communication และ signal transduction โดยเฉลี่ยเท่ากัน 4.83 เปอร์เซ็นต์ น่าสังเกตว่าทั้งสองกระบวนการนี้มีการแสดงออกทุกช่วงเวลา มีจำนวนยีนและสัดส่วนที่พบในแต่ละช่วงเวลาเท่ากัน ได้แก่ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 (3.75%), 6 (5.71%), 2 (4.76%) และ 3 ยีน (4.76%) ตามลำดับ รองลงมาเป็นกลุ่มยีนที่พบในกระบวนการ actin filament-based process, movement of cell or subcellular component, cellular developmental process, export from cell, cell cycle และ cell cycle process โดยกลุ่มยีนเหล่านี้พบที่มีการแสดงออกในทุกช่วงเวลาและจำนวนยีนที่พบในแต่ละเวลามีจำนวนใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีกระบวนการที่น่าสนใจ ได้แก่ กระบวนการ cell death โดยเฉลี่ย 1.72% โดยพบการแสดงออกของยีนเฉพาะช่วงเวลาเริ่มต้นของการทดสอบเท่านั้นในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 3 และ 2 ยีน แต่ไม่พบการแสดงออกหลังชั่วโมงที่ 6 ของการทดสอบ

นอกจากกระบวนการในระดับเซลล์ที่มีสัดส่วนสูงที่สุดในกลุ่มยีน BP กระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่พบรองลงมาโดยเฉลี่ย 19.48 เปอร์เซ็นต์ จึงได้วิเคราะห์เพิ่มเติมในยีนกลุ่มนี้ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในระดับเซลล์มากที่สุด โดยเฉลี่ย 20.57 เปอร์เซ็นต์ โดยพบสูงที่สุดเช่นเดียวกับคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ คือ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 34 ยีน (20.86%) จาก 163 ยีน ที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดที่พบในช่วงเวลานี้ แต่พบว่าทุกช่วงเวลาทดสอบมีสัดส่วนใกล้เคียงกันแม้ว่าช่วงเวลาอื่นพบยีนจำนวนน้อยกว่า โดยชั่วโมง

ที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 24 ยีน (19.20%) จากทั้งหมด 125 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดในช่วงเวลานี้ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 18 ยีน (21.18%) จากทั้งหมด 85 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดในช่วงเวลานี้ และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 18 ยีน (21.43%) จากทั้งหมด 84 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดในช่วงเวลานี้ กระบวนการที่พบรองลงมาสามลำดับพบว่ามีสัดส่วนใกล้เคียงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในระดับเซลล์ ได้แก่ กระบวนการ organic substance metabolic process, primary metabolic process และ nitrogen compound metabolic process โดยมีสัดส่วน 20.35, 19.69 และ 19.04 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจำนวนยีนที่มีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และจำนวนยีนมีการลดลงหลังชั่วโมงที่ 6 เช่นเดียวกัน แต่ในกระบวนการ nitrogen compound metabolic process สัดส่วนในแต่ละช่วงเวลาการทดสอบมีความแตกต่างกันมาก โดยมีสัดส่วนต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 เฉลี่ย 16.00 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนมีการเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เฉลี่ย 22.35 เปอร์เซ็นต์ และลดลงที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เฉลี่ย 20.24 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการรองลงมาเป็นกระบวนการ biosynthetic process โดยเฉลี่ย 10.07 เปอร์เซ็นต์ พบการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (11.66%) จำนวน 19 ยีน แม้ว่าในช่วงเวลาอื่น จะพบจำนวนยีนน้อยกว่าเท่าตัวของช่วงเวลาที่พบสูงสุด แต่พบว่ามีสัดส่วนในแต่ละช่วงเวลาใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนเท่ากับ 8.80, 10.59 และ 8.33 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 27

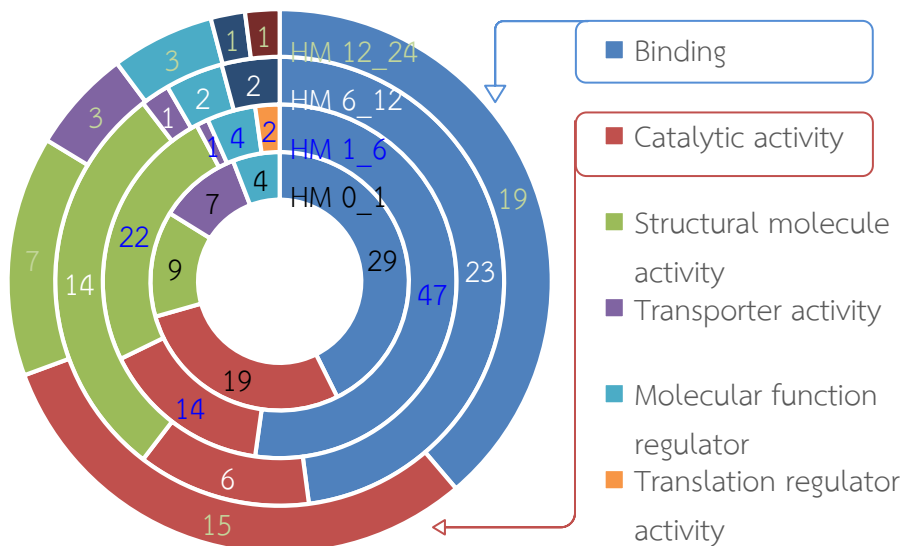


ภาพที่ 27 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) (กราฟวงกลม) และข้อมูลสัดส่วนที่พบมากของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในระดับเซลล์ (cellular process) (กราฟแท่งด้านขวา) กับข้อมูลสัดส่วนที่สำคัญของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic process) (กราฟแท่งด้านซ้าย) โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24

คุณสมบัติด้าน **หน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF)** มีโปรตีนเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุลต่างๆ หลายหน้าที่ อาทิเช่น binding, catalytic activity, structural molecule activity, transporter activity, molecular function regulator, translation regulator activity และ transcription regulator activity โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้ มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบเช่นเดียวกัน แต่มีลำดับเช่นเดียวกับการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์และกระบวนการชีวภาพ โดยพบสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 90 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 68 ยีน และเมื่อติดตามตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์ติดเชื้อแล้วพบว่า มีจำนวนยีนแตกต่างกันไม่มากนัก แต่พบว่าจำนวนยีนลดลงเกือบสองเท่า จากจำนวนที่พบสูงสุด โดยชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เหลือเพียงจำนวน 48 ยีน และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 49 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละหน้าที่ในระดับโมเลกุลพบว่าเกี่ยวข้องกับหน้าที่ binding มากที่สุดในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 46.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบว่าเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุล โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวนถึง 47 ยีน (52.22%) จากยีนทั้งหมด 90 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น ในขณะที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 29 ยีน โดยเฉลี่ย 42.65 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้งสองช่วงเวลามีสัดส่วนแตกต่างกันถึง 9.58 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จะมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวของเวลาที่พบสูงสุด โดยพบยีนจำนวน 23 ยีน (47.92%) และ 19 ยีน (38.78%) ตามลำดับ สัดส่วนของทั้งสองช่วงเวลานี้แตกต่างจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ค่อนข้างมากเช่นกัน หน้าที่ catalytic activity ถูกพบรองลงมาจากกระบวนการในระดับเซลล์โดยเฉลี่ย 21.18 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวนยีนมากที่สุดจำนวน 19 ยีน (27.94%) ในขณะที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 14 ยีน (15.56%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 15 ยีน (30.61%) แม้ทั้งสองช่วงเวลาข้างต้นพบจำนวนยีนใกล้เคียงกันแต่พบว่ามีส่วนแตกต่างกันอย่างมาก และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวนยีนต่ำสุด จำนวน 6 ยีน (12.50%) โดยตั้งข้อสังเกตว่าสัดส่วนของยีนที่พบมีสัดส่วนสูงในชั่วโมงแรก คือ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และในช่วงสุดท้ายของการทดสอบ คือ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 และมีสัดส่วนต่ำในช่วงกลางของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 หน้าที่ที่ถูกพบรองมาเป็นหน้าที่ structural molecule activity โดยมีค่าเฉลี่ย 20.39 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับสัดส่วนของหน้าที่ catalytic activity โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนมากที่สุด 22 ยีน (24.44%) กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่นี้พบว่ามีจำนวนและสัดส่วนของยีนที่มีการแสดงออกตรงข้ามกับยีนของหน้าที่ catalytic activity โดยพบการแสดงออกสูงในช่วงกลางของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 22 ยีน (24.44%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 14 ยีน (29.17%) และมีการแสดงออกต่ำในช่วงต้นและช่วงท้ายของการทดสอบ โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 9 ยีน (13.24%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 7 ยีน (14.29%) เป็นที่น่าสังเกตว่าในกระบวนการข้างต้นทั้งหมดอันดับที่พบยีนสูงสุดมีสัดส่วนของยีนที่พบแตกต่างกันค่อนข้างมากกับช่วงเวลาที่ยีนแสดงออกจำนวนน้อย หน้าที่ molecular function ถูกพบรองลงมาเฉลี่ย 5.10% โดยมีจำนวนและสัดส่วนของยีนที่มีการแสดงออกใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา หน้าที่ลำดับรองลงมาเป็นหน้าที่ transporter activity โดยเฉลี่ย 4.71 เปอร์เซ็นต์ ในหน้าที่นี้พบว่ากลุ่มยีนมีการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงแรกของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 7 ยีน (10.29%) และลดลงหลังชั่วโมงที่ 1 จนสิ้นสุดการทดสอบ

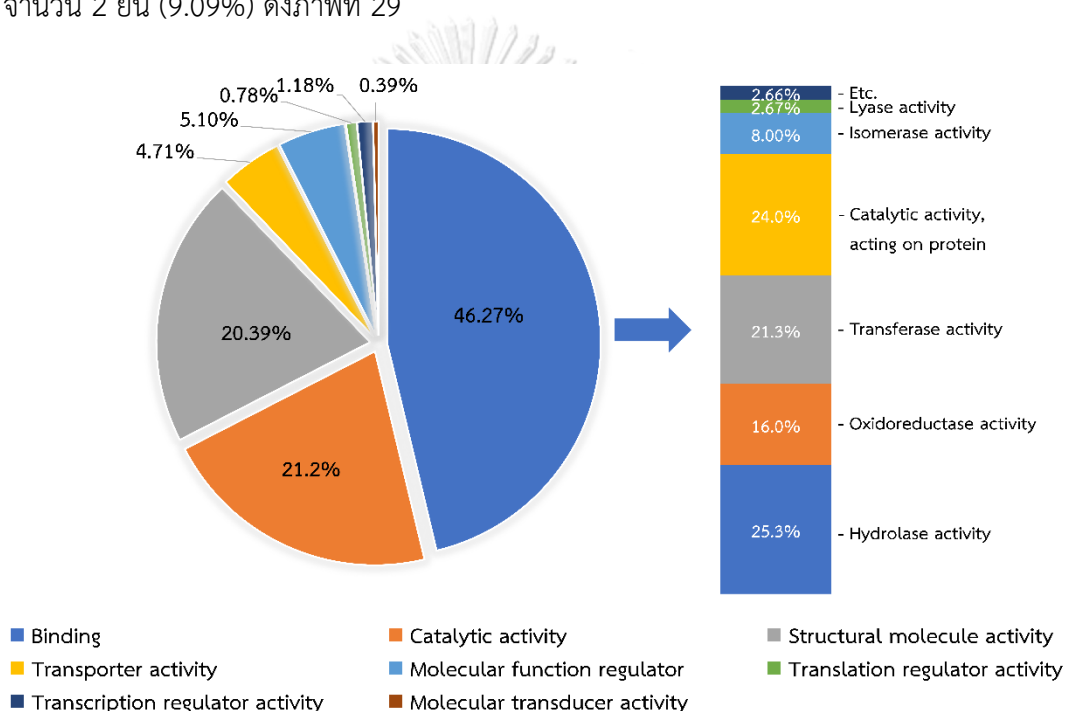
นอกจากนี้จำนวนยีนที่พบค่าใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 1 ยีน (1.11%) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 1 ยีน (2.08%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (6.12%) ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ จำนวน 255 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24)

ด้วยสัดส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ catalytic activity มีค่าสูง (ค่าเฉลี่ย 21.18%) และคณะผู้วิจัยต้องการวิเคราะห์บทบาทของโปรตีนในการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ทำให้มีการวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของหน้าที่ catalytic activity ได้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็น hydrolase activity มากที่สุด โดยเฉลี่ย 25.33 เปอร์เซ็นต์ พบสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 8 ยีน (32.00%) จาก 25 ยีน ที่แสดงออกเกี่ยวกับหน้าที่ catalytic activity ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลานี้ และมีสัดส่วนใกล้เคียงกับช่วงท้ายของการทดสอบที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 6 ยีน (27.27%) จากทั้งหมด 22 ยีนที่แสดงออกเกี่ยวกับหน้าที่ catalytic activity ทั้งหมดที่พบในช่วงเวลานี้ ขณะที่พบว่าช่วงกลางของการทดสอบในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และ 6 <-> 12 พบจำนวนยีนน้อยลงกว่าเท่าตัว โดยพบจำนวน 3 (15.79%) และ 2 ยีน (22.22%) ตามลำดับ การทำหน้าที่เป็น catalytic activity, acting on a protein ถูกพบรองลงมาโดยเฉลี่ย 24.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการแสดงออกสูงสุดที่ช่วงเวลาที่ท้ายของการทดสอบที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 7 ยีน (31.82%) ในขณะที่ช่วงก่อนหน้าตั้งแต่เริ่มการทดสอบจำนวนยีนที่แสดงออกใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบยีนจำนวน 4, 5 และ 4 ตามลำดับ แต่พบว่าสัดส่วนของยีนในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างกัน ในช่วงแรกของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 1 <-> 6 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันเท่ากับ 16.00 และ 21.05 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงท้ายของการทดสอบชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันเช่นเดียวกันเท่ากับ 33.33 และ 31.82

เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นการทำหน้าที่เป็น transferase activity โดยเฉลี่ย 21.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยีนที่พบมีค่าใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลาการทดสอบ โดยชั่วโมงที่ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 4 ยีน (16.00%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 5 ยีน (26.32%) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 4 ยีน (44.44%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (13.61%) แต่เมื่อสังเกตสัดส่วนของการแสดงออกของยีนจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันมาก โดยชั่วโมงที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนสูงสุด รองลงมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 0 <-> 1 กับ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน การทำหน้าที่เป็น oxidoreductase activity ถูกพบรองลงมา โดยเฉลี่ย 16.00 เปอร์เซ็นต์ พบการแสดงออกสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 6 ยีน (24.00%) รองลงมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 4 ยีน (21.05%) โดยไม่พบการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และพบการแสดงออกของยีนอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 2 ยีน (9.09%) ดังภาพที่ 29



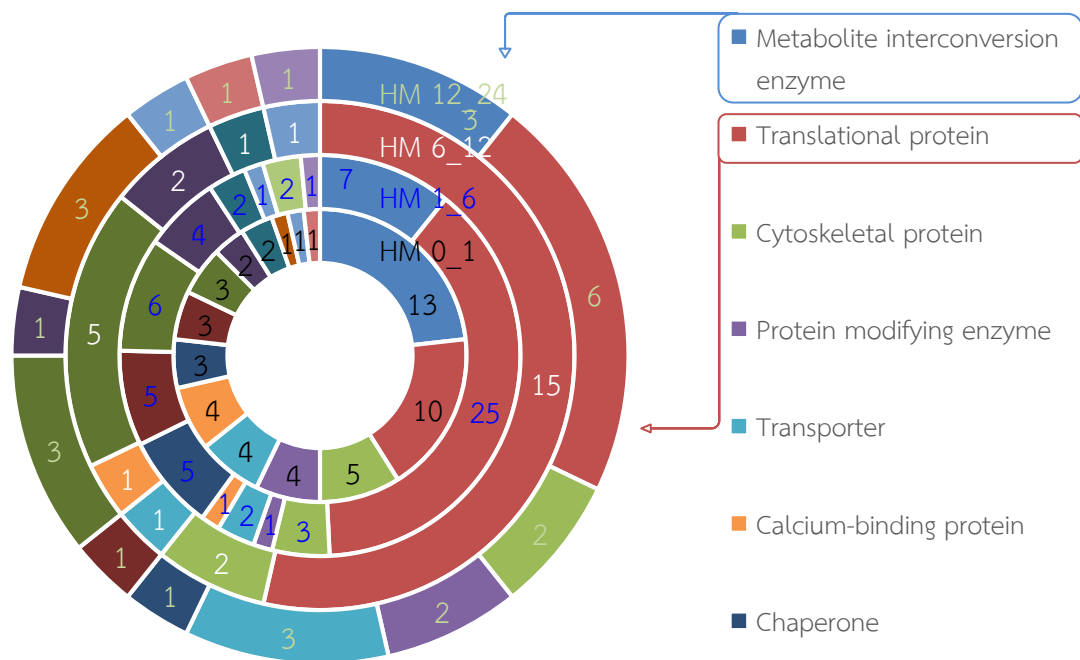
ภาพที่ 29 สัดส่วนของยีนของมนุษย์ที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) (กราฟวงกลม) และข้อมูลสัดส่วนที่พบมากของยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ catalytic activity (กราฟแท่งด้านขวา) โดยเฉลี่ยจากจำนวนยีนทั้ง 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24

คุณสมบัติด้าน **กลุ่มโปรตีน (PC)** มีโปรตีนที่มีคุณสมบัติเหมือนกันถูกจัดกลุ่มเป็นกลุ่มโปรตีนหลายกลุ่ม อาทิเช่น metabolite interconversion enzyme, translational protein, cytoskeletal protein, protein modifying enzyme, transporter, calcium-binding protein, nucleic acid binding protein, membrane traffic protein และ transfer/carrier protein โดยพบยีนของโปรตีนที่ถูกจัดเป็นกลุ่มโปรตีนต่างๆ เหล่านี้มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบ

เช่นเดียวกัน แต่มีลำดับเช่นเดียวกับการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ กระบวนการชีวภาพและหน้าที่ในระดับโมเลกุล โดยพบสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 65 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 56 ยีน และเมื่อติดตามตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์ติดเชื้อแล้วพบว่ามียีนจำนวนยีนเท่ากันแต่พบว่าจำนวนยีนลดลงเกือบสองเท่า โดยชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เหลือยีนช่วงเวลาละ 28 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละกลุ่มโปรตีน พบว่ากลุ่มโปรตีน translation มีจำนวนยีนมากที่สุด ในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 31.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในการจัดกลุ่มโปรตีน โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวนถึง 25 ยีน (38.46%) จากยีนทั้งหมด 65 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น ในขณะที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 15 ยีน (53.57%) จากยีนทั้งหมด 28 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 10 ยีน (17.86%) จากยีนทั้งหมด 56 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 6 ยีน (21.43%) จากยีนทั้งหมด 28 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น จากสัดส่วนของยีนที่มีการแสดงออก สังเกตสัดส่วนตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 มีการเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และลดลงในช่วงท้ายการทดสอบที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 กลุ่มโปรตีน metabolite interconversion enzyme ถูกพบรองลงมาจากกลุ่มโปรตีน translation โดยเฉลี่ย 12.99 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวนยีนมากที่สุดจำนวน 13 ยีน (23.21%) ในขณะที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนลดลงเหลือ 7 ยีน (10.77%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ไม่พบการแสดงออกของยีน โดยการแสดงออกยีนกลับมาอีกครั้งในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (10.71%) จากสัดส่วนการแสดงออกของยีน สังเกตได้ว่าชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันมาก รองลงมาเป็นกลุ่มโปรตีน nucleic acid binding โดยเฉลี่ย 9.60 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนและสัดส่วนของยีนที่พบมีลักษณะคล้ายกับการแสดงออกของยีนของกลุ่มโปรตีน translational protein โดยสัดส่วนการแสดงออกของยีนเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 โดยเฉลี่ย 5.36 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบเฉลี่ย 9.23 เปอร์เซ็นต์ และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบเฉลี่ย 17.86 เปอร์เซ็นต์ และลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เหลือเฉลี่ย 10.71 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มโปรตีน cytoskeletal ถูกพบรองลงมา โดยเฉลี่ย 6.78 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจำนวนยีนที่มีการแสดงออกในแต่ละช่วงการทดสอบมีค่าใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 5 ยีน (8.93%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 3 ยีน (4.62%) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 2 ยีน (7.14%) และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 2 ยีน (7.14%) สังเกตได้ว่ามีเพียงชั่วโมงที่ 1 <-> 6 เท่านั้นที่พบสัดส่วนแตกต่างจากช่วงเวลาอื่นค่อนข้างมากและมีสัดส่วนต่ำที่สุด กลุ่มโปรตีน transporter และ membrane traffic protein มีการแสดงออกยีนในทุกช่วงเวลาและมีจำนวนใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาการทดสอบในแต่ละกลุ่มโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนของยีนพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยกลุ่มโปรตีน transporter มีสัดส่วนสูงในช่วงแรกและท้ายการทดสอบ โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบสัดส่วนเฉลี่ย 7.14 เปอร์เซ็นต์ และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบสัดส่วนเฉลี่ย 10.71 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ช่วงกลางการทดสอบมีสัดส่วนต่ำ โดยที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบสัดส่วนเฉลี่ย 3.08 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ที่พบสัดส่วนเฉลี่ย 3.57 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มโปรตีน membrane traffic protein มีสัดส่วนสูงในช่วงกลางการทดสอบ โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 มีสัดส่วนเฉลี่ย 6.15 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ที่มีสัดส่วนเฉลี่ย 7.14 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ช่วงต้นและ

ท้ายของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบสัดส่วนเฉลี่ย 3.57 เปอร์เซ็นต์ โดยเท่ากับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ที่มีสัดส่วนเฉลี่ย 3.57 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีกลุ่มโปรตีนอื่นๆ เช่น chaperone และ protein-binding activity modulator ที่มีสัดส่วนเฉลี่ยเท่ากันเท่ากับ 5.08 เปอร์เซ็นต์ และมีการแสดงออกเหมือนกัน โดยมีจำนวนยีนที่มีการแสดงออกเท่ากันในแต่ละช่วงเวลาทดสอบและไม่พบการแสดงออกของยีนในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 รวมถึงกลุ่มโปรตีน intercellular signal molecule พบจำนวนยีนที่มีการแสดงออกและสัดส่วนใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลาการทดสอบ ดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 สัดส่วนและจำนวนของยีนของมนุษย์ จำนวน 177 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านกลุ่มโปรตีน (PC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24)

คุณสมบัติด้าน **วิถี (PW)** พบว่ามีโปรตีนเกี่ยวข้องกับวิถีต่างๆ ของเซลล์หลายวิถี และมีความหลากหลายในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ โดยพบยีนสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 58 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 30 ยีน ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 จำนวน 24 ยีน และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 12 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละวิถีที่พบ จากการเปรียบเทียบร่วมกันในแต่ละช่วงเวลาทั้ง 4 ช่วงเวลา พบว่ามี 3 วิถีที่พบในทุกช่วงเวลาทดสอบ ได้แก่ integrin signaling pathway, inflammation mediated by chemokine and cytokine และ Huntington disease โดยวิถี integrin signaling pathway มีจำนวนยีนมากที่สุดในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 12.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในคุณสมบัติด้านวิถี โดยพบจำนวนยีนมากที่สุด

ที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 6 ยีน (10.34%) จากยีนทั้งหมด 58 ยีนที่พบในช่วงเวลานั้น ในขณะที่ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 4 ยีน (13.33%) ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 24 ยีน (12.50%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 12 ยีน (16.67%) รองลงมาเป็นวิถี Huntington disease โดยเฉลี่ย 7.26 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวนยีนมากที่สุดจำนวน 5 ยีน (8.62%) ในขณะที่ช่วงเวลาทดสอบอื่นพบการแสดงออกยีนน้อยมาก โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 1 ยีน (4.17%) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 1 ยีน (8.33%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 2 ยีน (6.67%) แต่เมื่อสังเกตสัดส่วนของยีนที่แสดงออกพบว่ามีเพียงชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ที่สัดส่วนแตกต่างจากช่วงเวลาอื่นมากและมีสัดส่วนน้อยที่สุด วิถี inflammation mediated by chemokine and cytokine ถูกพบรองลงมา มีค่าเฉลี่ย 6.45 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจำนวนยีนที่มีการแสดงออกมีค่าใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบจำนวน 1 ยีน (4.17%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 3 ยีน (5.17%) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 1 ยีน (8.33%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 3 ยีน (10.00%) สังเกตเห็นได้ว่าสัดส่วนของยีนมีการเพิ่มขึ้น โดยเริ่มต้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ไปจนถึงสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ตามลำดับ

ลำดับต่อมาเป็นวิถีที่พบร่วมกัน 3 ช่วงเวลา โดย 1. วิถี EGF receptor signaling pathway และ FGF signaling pathway พบการแสดงออกในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 โดย FGF signaling pathway มีสัดส่วนเฉลี่ย 4.03 เปอร์เซ็นต์ และมีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 3 ยีน (10.00%) ตามด้วยวิถี EGF receptor signaling pathway โดยเฉลี่ย 3.23 เปอร์เซ็นต์ มีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เช่นกัน พบจำนวน 2 ยีน (6.67%) และ 2. วิถี p53 pathway พบการแสดงออกในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 โดยเฉลี่ย 2.42 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าทั้งสามช่วงเวลามีจำนวนยีนที่มีการแสดงออกเท่ากันช่วงเวลละ 1 ยีน แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนยีนที่พบ พบว่าในชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันเท่ากับ 4.17 และ 3.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนถึง 8.33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีวิถีที่พบร่วมกันใน 2 ช่วงเวลาที่ น่าสนใจ โดย 1. ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 และชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ได้แก่วิถี ATP synthesis, De novo purine biosynthesis และ TCA cycle 2. ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ได้แก่ วิถี FAS signaling pathway, VEGF pathway และ p38 MAPK pathway 3. ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ได้แก่ Alzheimer disease-amyloid secretase pathway และ Notch signaling pathway และ 4. ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ได้แก่ วิถี B cell activation, T cell activation และ Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway

รวมถึงมีบางวิถีที่พบเฉพาะในแต่ละช่วงเวลาที่ น่าสนใจ โดย 1. ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 พบวิถี pyruvate metabolism, PI3 kinase pathway, blood coagulation, Glycolysis และ Toll receptor signaling pathway 2. ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบวิถี Cadherin signaling pathway และ Ras pathway 3. ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบวิถี angiogenesis และ 4. ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบวิถี JAK/STAT signaling pathway, apoptosis signaling pathway และ Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin

4.5.3 ผลการวิเคราะห์วิถี (Pathway analysis)

จากการนำโปรตีนของมนุษย์ที่ได้จากการทดสอบนี้ทั้งหมดเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล DAVID เพื่อวิเคราะห์วิถีที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม โดยฐานข้อมูลดังกล่าวได้รวบรวมวิถีต่างๆ ภายในร่างกายจากฐานข้อมูล KEGG pathway โดยผลลัพธ์จากการวิเคราะห์จะแสดงให้เห็นจำนวนโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีและค่านัยยะสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถวิเคราะห์วิถีที่เกี่ยวข้อง ทำให้บ่งชี้ได้ว่าวิถีใดมีความสำคัญและมีบทบาทต่อเซลล์ในระดับใด จากผลการวิเคราะห์พบวิถีที่เกี่ยวข้องตามช่วงเวลาต่างๆ ดังภาพที่ 31

ในช่วงเวลาที่ 0 <-> 1 พบว่าวิถี Ribosome มีนัยยะสำคัญทางสถิติสูงสุด บ่งชี้ว่าวิถีนี้มีความสำคัญในการตอบสนองของเซลล์ต่อการติดเชื้อ โดย Ribosome pathway มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแสดงออกของยีนและการสังเคราะห์โปรตีน ลำดับถัดไปเป็น Carbon metabolism pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ โดยพบกระบวนการอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, Citrate cycle (TCA cycle) และ Pyruvate metabolism ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ได้เพิ่มการสังเคราะห์พลังงานสำหรับใช้ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ ลำดับถัดไปเป็นวิถี Parkinson's disease และ Huntington's disease เมื่อพิจารณาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในวิถีดังกล่าว พบว่าเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP ผ่านกระบวนการ oxidative phosphorylation ในไมโทคอนเดรีย ดังนั้นสองวิถีนี้จึงช่วยอธิบายถึงกระบวนการสังเคราะห์พลังงานให้เห็นภาพชัดเจนขึ้น ลำดับสุดท้ายวิถี Biosynthetic of antibiotics ที่บ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์มีกระบวนการในการต่อต้านการติดเชื้อ โดยการตอบสนองในบทบาทของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ

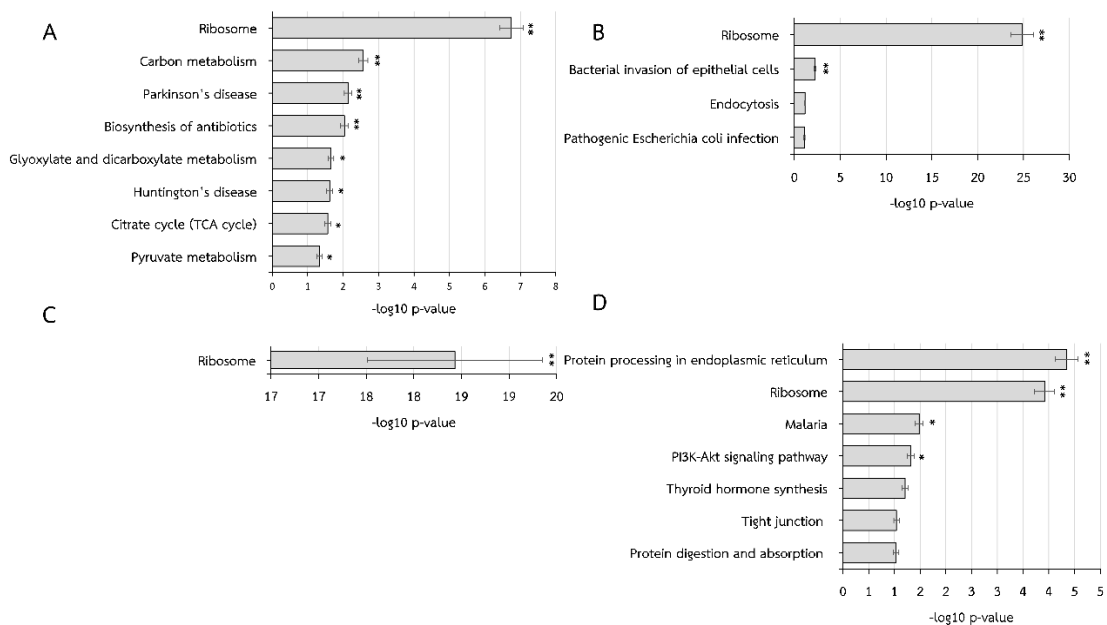
ในช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 พบว่าวิถี Ribosome มีนัยยะสำคัญทางสถิติสูงสุด เช่นเดียวกันและมีค่าสูงสุดในช่วงเวลานี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อสูงสุดในช่วงเวลานี้ ลำดับถัดไปเป็นวิถี Bacterial invasion of epithelial cells ซึ่งบ่งชี้ถึงการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ภายในเซลล์ ทั้งยังพบวิถีอื่นที่แสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อภายในเซลล์ เช่น วิถี Endocytosis และ Pathogenic *Escherichia coli* infection แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิถีดังกล่าวไม่แสดงว่ามีนัยยะสำคัญทางสถิติ

ในช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 พบวิถีของ Ribosome เพียงวิถีเดียว บ่งชี้ว่าในช่วงเวลานี้วิถีดังกล่าวยังคงมีความสำคัญต่อการสนองต่อการติดเชื้อ

ช่วงเวลาสุดท้ายในช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 พบว่าวิถีของ Protein processing in endoplasmic reticulum มีนัยยะสำคัญทางสถิติสูงสุด บ่งชี้ว่ามีการขนส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและเกิดกระบวนการม้วนพับของโปรตีนขึ้นภายใน ลำดับถัดไปเป็นวิถี Ribosome บ่งชี้ว่าการสังเคราะห์โปรตีนยังคงมีความสำคัญในช่วงเวลานี้และบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์โปรตีนกับการขนส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ลำดับถัดไปเป็นวิถีของ Malaria โดยโปรตีนที่พบเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ ที่อาจบ่งชี้ถึงบทบาทของการเข้าจับกันระหว่างเซลล์ที่มีความสำคัญในช่วงเวลานี้ ลำดับถัดไปเป็นวิถีของ PI3K-Akt signaling pathway โดยวิถีดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการของเซลล์หลายรูปแบบ ได้แก่

การสังเคราะห์โปรตีน อะพอพโทซิส เมตาบอลิซึม และวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle) นอกจากนี้ยังพบวิถีอื่นๆ ที่พบได้ เช่น Thyroid hormone synthesis, Tight junction และ Protein digestion and absorption

จากผลการวิเคราะห์วิถีที่เกี่ยวข้องทั้งหมดพบว่าวิถี Ribosome เป็นวิถีหลักในการตอบสนองต่อการติดเชื้อและมีนัยยะสำคัญในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกัน บ่งชี้ถึงการสังเคราะห์โปรตีนที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาเพื่อทำหน้าที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยช่วงเวลา 0 <-> 1 แสดงถึงวิถีที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์พลังงานเป็นหลัก ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 พบวิถีที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อภายในเซลล์ ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 พบวิถีเกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนและ signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญต่างๆของเซลล์ เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงเวลา 6 <-> 12 พบเพียงวิถี Ribosome เท่านั้น จากวิถีในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกันนี้บ่งชี้ถึงการดำเนินไปของการติดเชื้อ ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ผ่านทาง EVs ที่เกี่ยวข้องกับ pathway จะถูกอธิบายในหัวข้อต่อไป

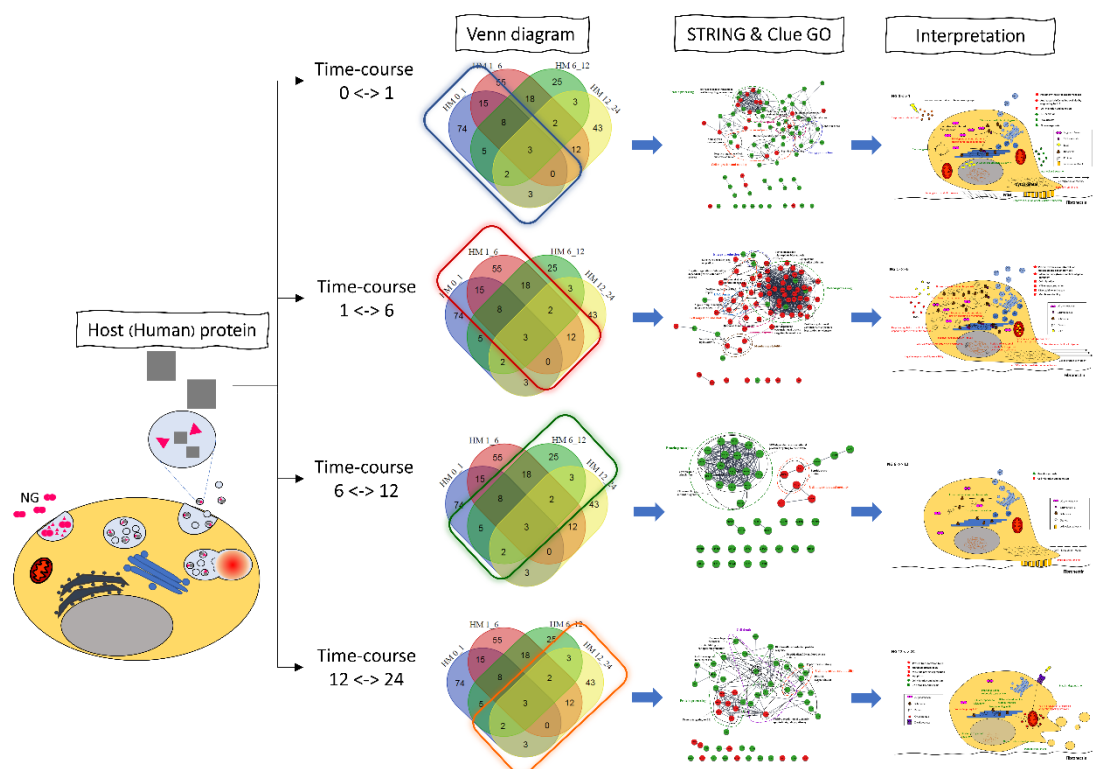


ภาพที่ 31 วิถีที่เกี่ยวข้องของโปรตีนมนุษย์ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 4 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 0 <-> 1 (HM 0_1) (A), ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (HM 1_6) (B), ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (HM 6_12) (C) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (HM 12_24) (D)

4.5.4 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (Protein-protein interaction: PPI)

การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ได้พิจารณาจากฐานข้อมูล STRING v.11.0 ซึ่งกำหนดระดับ confidence เท่ากับ 0.7 ทำการวิเคราะห์แยกแต่ละช่วงเวลาทั้ง 4 ช่วงเวลา และนำเสนอผลการวิเคราะห์ด้วย visualization ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Cytoscape v.3.7.2 เพื่อ

แสดงภาพรวมของ PPI network ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีนทั้งชนิด up regulation และ down regulation พร้อมกับแสดงปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ biological process ด้วยโปรแกรม Clue GO v.2.5.7 ทำให้ทราบถึงบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการ biological process โดยการแสดงออกของโปรตีนใน EVs สามารถบ่งชี้ถึงความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่เกิดจากการตอบสนองและการทำหน้าที่ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้างต้นถูกแสดงในภาพที่ 32

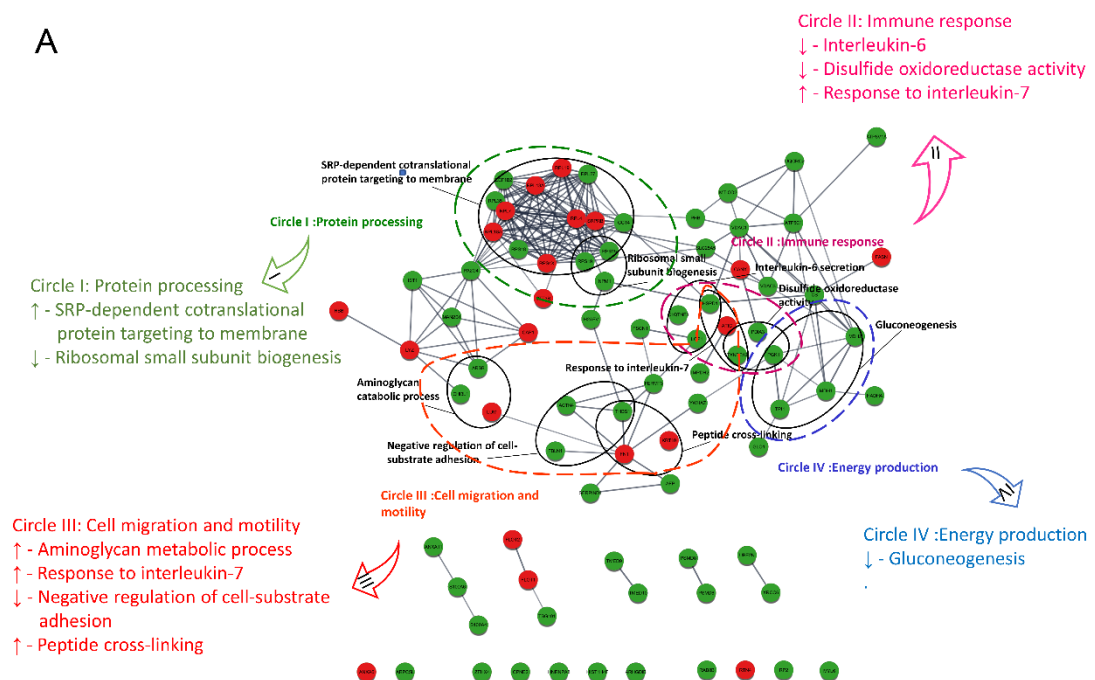


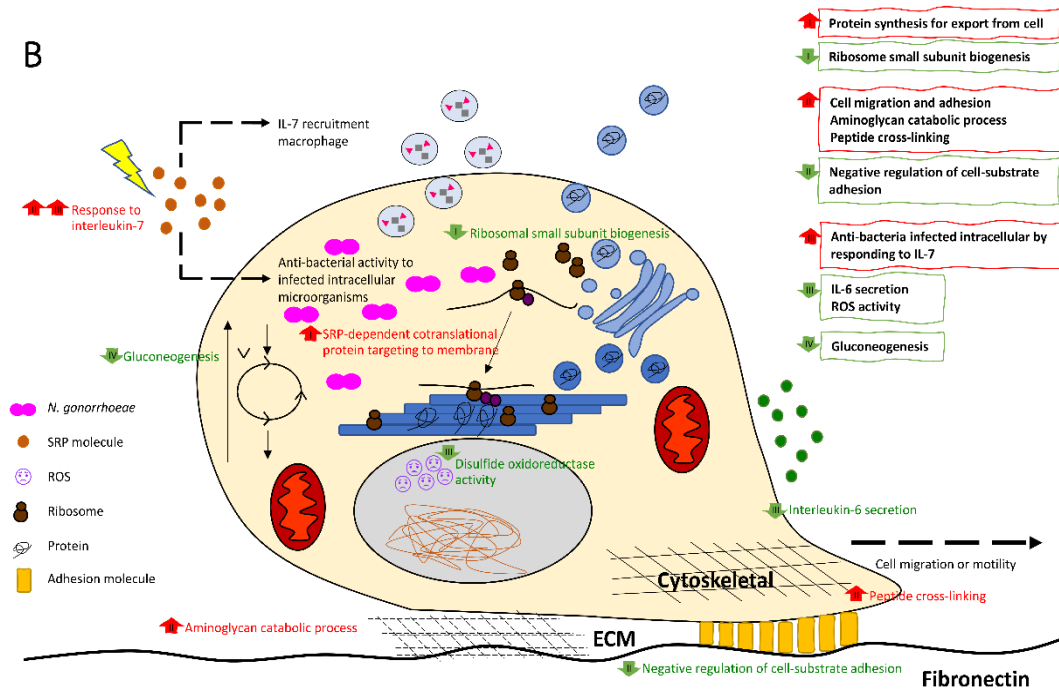
ภาพที่ 32 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนมนุษย์ (Protein-protein interaction)

จากแผนภาพปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (PPI network) ของช่วงเวลาที่ 0 <-> 1 (ภาพที่ 33) biological process ที่พบแสดงให้เห็นว่าเซลล์ได้เริ่มกระบวนการติดเชื้อและมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ สามารถแบ่งกลุ่มของ biological process ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่ม Protein processing (I) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน จะเห็นได้ว่าเซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น โดยเป็นการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อขนส่งออกไปยังภายนอกเซลล์จาก SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane ที่มีการทำงานเพิ่มขึ้น โดยพบว่า Ribosomal small subunit biogenesis มีการทำงานลดลง 2. กลุ่ม Immune response (II) แสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ ประกอบด้วย Response to interleukin-7 ที่มีการทำงานเพิ่มขึ้น โดยการตอบสนองต่อ IL-7 เกี่ยวข้องกับต่อต้านเชื้อจุลชีพ อย่างไรก็ตามกลับพบการลดการทำงานของ Interleukin-6 secretion และ Disulfide oxidoreductase activity ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Reactive oxygen species 3. กลุ่ม Cell-migration และ motility (III) เกี่ยวข้อง

กับการเคลื่อนที่ของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีเคลื่อนที่และการรวมกลุ่มของเซลล์ จากการทำงานเพิ่มขึ้นของ Aminoglycan metabolic process ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารประกอบ aminoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix (ECM) Response to IL-7 เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการรวมกลุ่มของเซลล์แมคโครฟาจ Peptide cross-linking ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ ได้แก่ Fibronectin (FN1) Keratin, type1 cytoskeletal 10 (KRT10) และ Thrombospondin 1 (THBS1) นอกจากนี้ยังพบการทำงานลดลงของ Negative regulation of cell-substrate adhesion ซึ่งเป็นการลดการทำงานของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ และ 4. กลุ่ม Energy production (IV) ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความต้องการใช้พลังงาน โดยพบการทำงานลดลงของ Gluconeogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานในการสร้างน้ำตาลกลูโคส

A

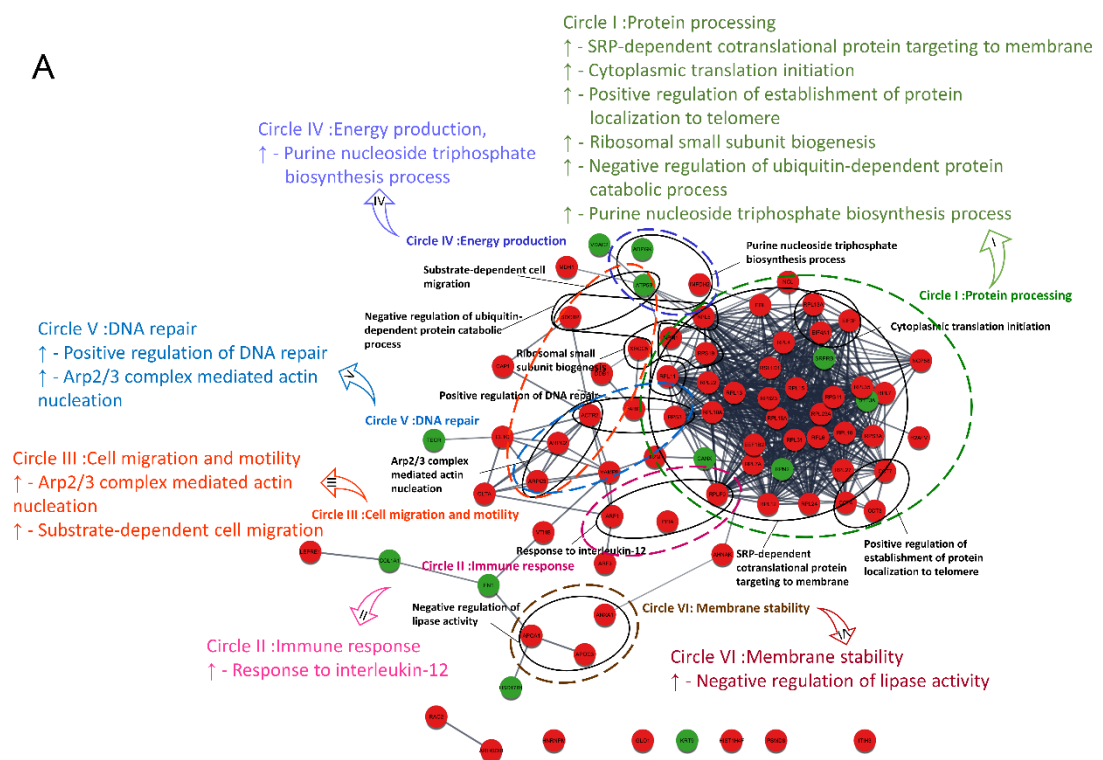


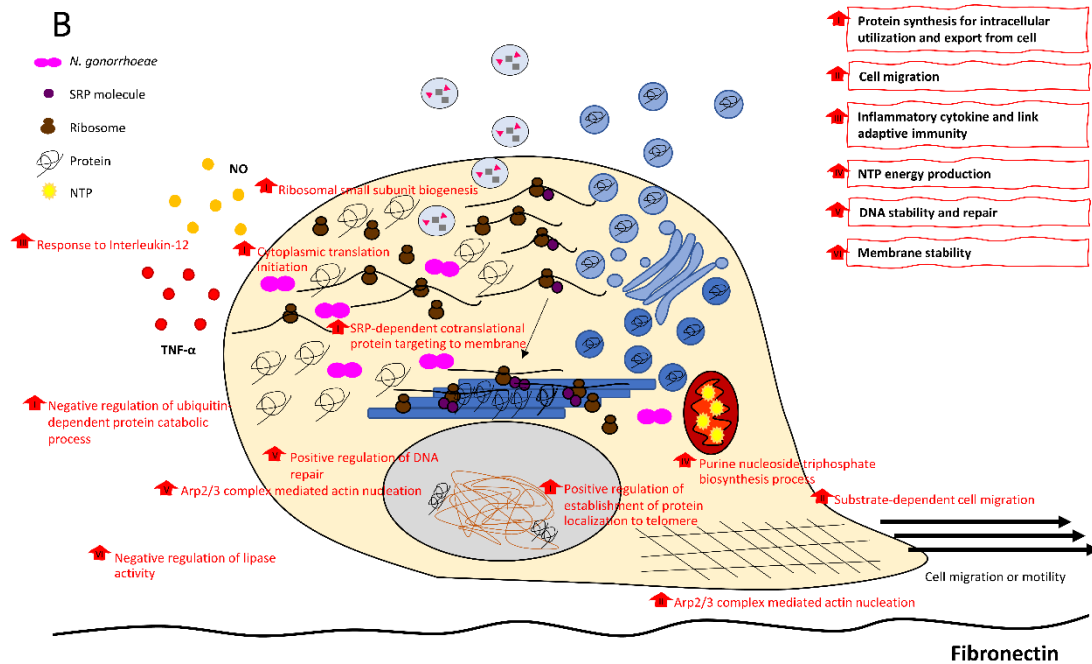


ภาพที่ 33 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 0 <-> 1 จากฐานข้อมูล STRING v.11.0 ด้วยโปรแกรม Cytoscape v.3.7.2 และความสัมพันธ์กับขบวนการ Biological process ที่สำคัญ (A) บทบาทและหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการ Biological process เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ (B)

จากแผนภาพปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (PPI network) ของช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 (ภาพที่ 34) biological process ที่พบแสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลานี้เซลล์มีการทำงานและตอบสนองต่อการติดเชื้อสูงสุด โดยโปรตีนเกือบทั้งหมดที่พบเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น สามารถแบ่งกลุ่มของ biological process ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่ม Protein processing (I) พบว่าเซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้นทั้งบริเวณไซโตพลาสซึมและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม จากการทำงานเพิ่มขึ้นของ Purine nucleoside triphosphate biosynthesis process ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ Cytoplasmic translation initiation, SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane และ Ribosomal small subunit biogenesis และ Negative regulation of ubiquitin-dependent protein catabolic process เป็นการลดการทำงานของโปรตีน ubiquitin ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสลายโปรตีน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยการทำงานเพิ่มขึ้นของ Positive regulation of establishment of protein localization to telomere ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีนไปยังบริเวณ telomere ของโครโมโซมเพื่อให้โครโมโซมมีความเสถียรและป้องกันการถูกทำลาย 2. กลุ่ม Immune response (II) พบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Response to interleukin-12 โดย IL-12 เป็นไซโตไคน์ที่ผลิตได้จาก antigen presenting cells โดยเฉพาะจากเซลล์แมคโครฟาจและ dendritic cell โดยมีฤทธิ์เป็น

pro-inflammatory molecule และมีบทบาทต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อภายในเซลล์ รวมถึงการส่งสัญญาณระหว่างภูมิคุ้มกันแบบกำเนิดกับแบบจำเพาะอีกด้วย 3. กลุ่ม Cell migration และ motility (III) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเคลื่อนที่สูง ผ่านการทำงานเพิ่มขึ้นของ Arp2/3 complex mediated actin nucleation โดยเป็นการต่อสายโปรตีน actin ของกระบวนการ actin polymerization และ Substrate-dependent cell migration ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ 4. กลุ่ม Energy production (IV) พบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Purine nucleoside triphosphate biosynthesis process โดยเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ 5. กลุ่ม DNA repair (V) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเพิ่มการซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยพบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Positive regulation DNA repair และ Arp2/3 complex mediated actin nucleation ซึ่งนอกจากจะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์แล้วยังเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเออีกด้วย และ 6. กลุ่ม Membrane stability (VI) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเพิ่มความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยพบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Negative regulation of lipase activity ในการลดการทำงานของของเอนไซม์ไลเปส ดังภาพที่ 34

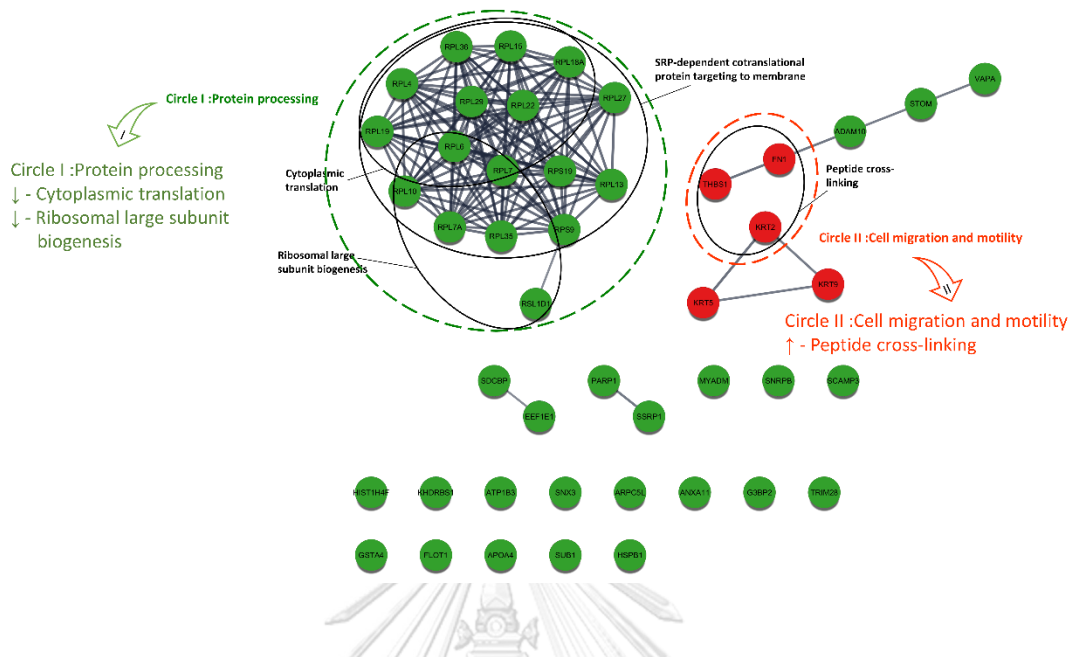




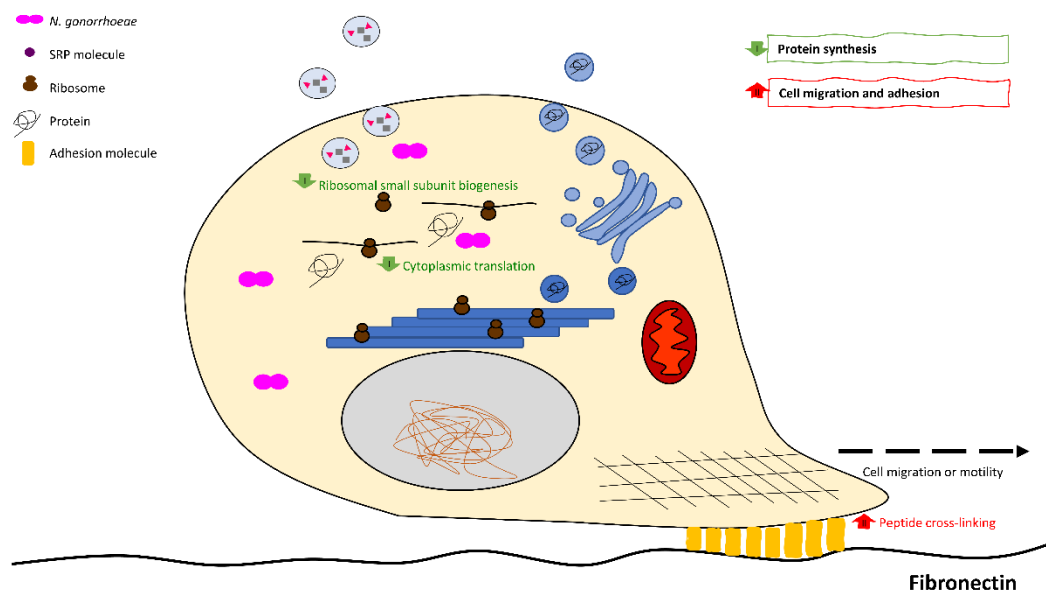
ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 จากฐานข้อมูล STRING v.11.0 ด้วยโปรแกรม Cytoscape v.3.7.2 และความสัมพันธ์กับขบวนการ Biological process ที่สำคัญ (A) บทบาทและหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการ Biological process เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ (B)

จากแผนภาพปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (PPI network) ของช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 (ภาพที่ 35) biological process ที่พบแสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลานี้เซลล์ลดการทำงานทั้งหมดของเซลล์ โดยโปรตีนเกือบทั้งหมดที่พบเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง สามารถแบ่งกลุ่มของ biological process ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. Protein processing (I) จะเห็นได้ว่าเซลล์ลดการสังเคราะห์โปรตีน โดยพบการทำงานลดลงของ Cytoplasmic translation และ Ribosomal large subunit process และ 2. Peptide cross-linking (II) โดยพบว่าเซลล์ยังคงมีการทำงานที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์อาจยังมีการเคลื่อนที่ในช่วงเวลานี้อยู่ ดังภาพที่ 35

A

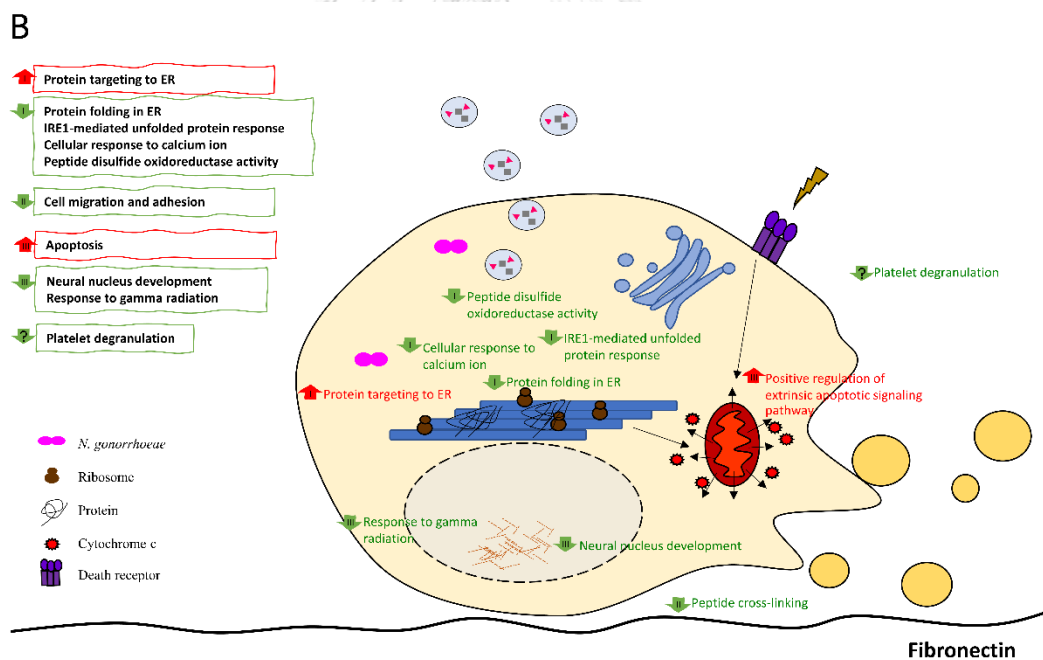
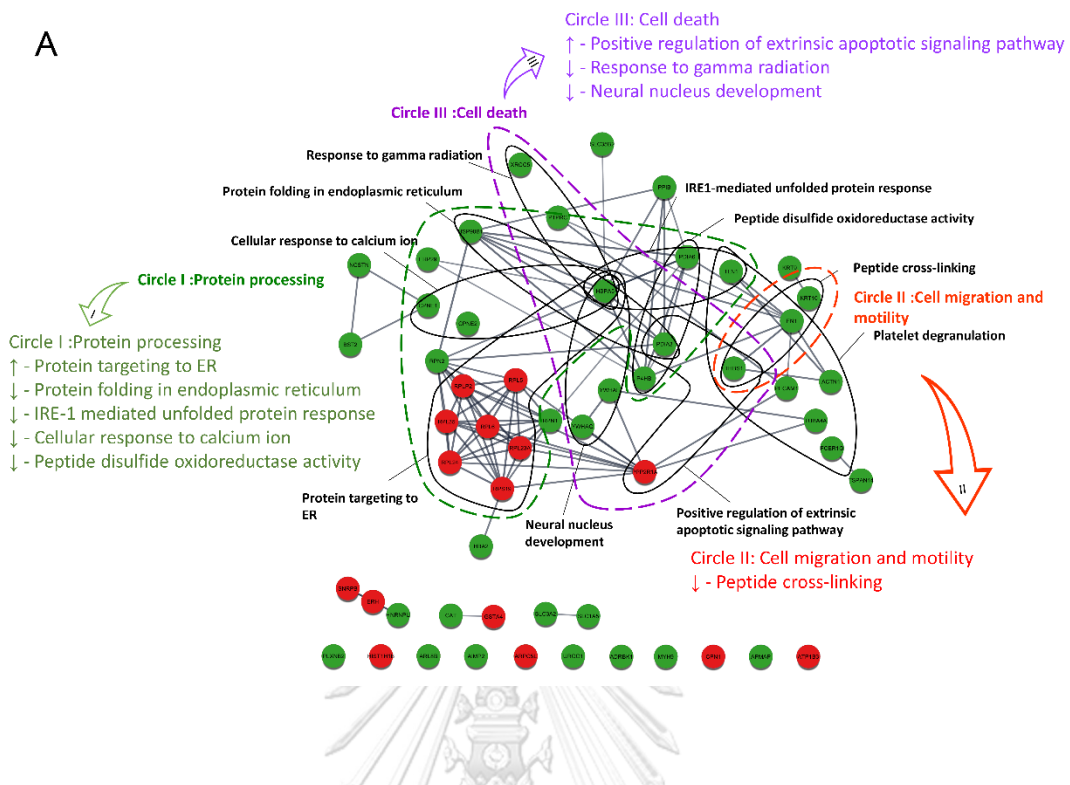


B



ภาพที่ 35 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 จากฐานข้อมูล STRING v.11.0 ด้วยโปรแกรม Cytoscape v.3.7.2 และความสัมพันธ์กับกระบวนการ Biological process ที่สำคัญ (A) บทบาทและหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการ Biological process เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ (B)

จากแผนภาพปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน (PPI network) ของช่วงเวลา 12 <-> 24 (ภาพที่ 36) biological process ที่พบแสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลานี้เซลล์ได้เข้าสู่กระบวนการอะพอพโทซิสผ่าน extrinsic pathway โดยการกระตุ้นจากการติดเชื้อ สามารถแบ่งกลุ่มของ biological process ได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ 1. Protein processing (I) พบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Protein targeting to ER แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเพิ่มการขนส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม สามารถบ่งชี้ได้ว่าภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมีการบรรจุโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก พบการงานลดลงของกระบวนการ ประกอบด้วย Protein folding in Endoplasmic reticulum ที่เกี่ยวข้องกับการม้วนพับของโปรตีนให้เป็นโครงสร้างที่ถูกต้อง บ่งชี้ว่าโปรตีนจำนวนมากในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมไม่เกิดการม้วนพับ Peptide disulfide oxidoreductase activity ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็นโปรตีน chaperone ในการม้วนพับของโปรตีน บ่งชี้ว่าเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมบรรจุโปรตีนที่ไม่มีการม้วนพับจำนวนมาก IRE-1 mediated unfolded protein response เป็นกระบวนการตอบสนองของโปรตีน IRE-1 เพื่อตอบสนองต่อสภาวะ ER stress ผ่านการกระตุ้นการลดกระบวนการถอดรหัส การลดลงของกระบวนการนี้แสดงให้เห็นว่าเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมอาจเกิดสภาวะ ER stress และไม่ได้รับการแก้ไข Cellular response to calcium ion แคลเซียมเป็นองค์ประกอบของ Calcium signaling pathway ที่ตอบสนองต่อสภาวะ ER stress โดยการกระตุ้นการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส จากกระบวนการทั้งหมดข้างต้น อาจบ่งชี้ว่าการกระบวนการอะพอพโทซิสที่เกิดขึ้นนอกจากเกิดผ่านกลไก extrinsic pathway แล้ว เป็นไปได้ว่าอาจเกิดผ่านกลไก intrinsic pathway จากสภาวะ ER stress อีกด้วย 2. Cell migration และ motility (II) พบการทำงานลดลงของ Peptide cross-linking ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด แสดงให้เห็นว่าเซลล์ในช่วงเวลานี้ไม่มีการเคลื่อนที่แล้ว 3. Cell death (III) พบการทำงานเพิ่มขึ้นของ Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway นอกจากนี้ยังพบการทำงานลดลงของ Response to gamma radiation ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงสภาวะที่เซลล์ไม่ตอบสนองต่อการสลายของดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการอะพอพโทซิส Neural nucleus development ที่อาจบ่งชี้ว่าเซลล์ไม่มีการรักษาสภาพของดีเอ็นเอและนิวเคลียสที่เกิดการสลายจากกระบวนการอะพอพโทซิส ดังภาพที่ 36



ภาพที่ 36 ผลการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 จากฐานข้อมูล STRING v.11.0 ด้วยโปรแกรม Cytoscape v.3.7.2 และความสัมพันธ์กับขบวนการ Biological process ที่สำคัญ (A) บทบาทและหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการ Biological process เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์ (B)

4.6 ผลการวิเคราะห์หาตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein marker candidate analysis) ของโปรตีนมนุษย์

จากผลการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Label-free quantification mass spectrometry และ PPI network สามารถจำแนกโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ตามแต่ละช่วงเวลาทดสอบซึ่งแบ่งตามกลุ่มของ biological process จากผลการวิเคราะห์ PPI ดังตารางที่ 4-7 (โปรตีนมนุษย์บ่งชี้ macrophage cells status) โดยในแต่ละกลุ่มของ biological process ประกอบด้วยโปรตีนทั้งโปรตีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ (โปรตีนที่ขีดเส้นใต้) และโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ การใช้โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในแต่ละช่วงเวลาสามารถบ่งชี้ถึงสถานะการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages status) ด้วยการแสดงออกของโปรตีนตามค่า Log2 ratio (ตัวเลขในวงเล็บ) ในขณะที่โปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ อาจใช้ในทำนายหรือการประเมินความก้าวหน้าสถานะการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages status progression)

ตารางที่ 4 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 0 <-> 1 ซึ่งแบ่งตามกลุ่มของ biological process ซึ่งแสดง symbol protein ของโปรตีนแต่ละชนิด และค่า Log2 ratio ในวงเล็บด้านท้าย โดยโปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ และโปรตีนที่ไม่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ

NG 0 <-> 1		
Process	Biological process	Protein
Protein processing	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	RPL13A (3.22), RPL18A (5.78), RPL19 (3.27), RPL27 (0.48), RPL35 (0.32), RPL4 (2.04), RPL7 (2.56), <u>RPS15 (0.47)</u> , <u>RPS18 (0.21)</u> , RPS19 (0.25), <u>RPS4X (3.94)</u>
	Ribosomal small subunit biogenesis	NPM1 (0.32), <u>RPS15 (0.47)</u> , RPS19 (0.25)
Cell migration and motility	Aminoglycan catabolic process	<u>ARSB (0.30)</u> , <u>CHI3L1 (0.29)</u> , <u>LUM (2.06)</u>
	Response to interleukin-7	<u>ATIC (3.05)</u> , <u>HSPD1 (0.24)</u> , PDIA3 (0.46)
	Negative regulation of cell-substrate adhesion	<u>ACTN4 (0.32)</u> , <u>FBLN1 (0.32)</u> , THBS1 (0.38)
	Peptide cross-linking	FN1 (16.92), KRT10 (3.08), THBS1 (0.38)
Immune response	Interleukin-6 secretion	<u>C1QTNF3 (0.46)</u> , <u>HSPD1 (0.24)</u> , <u>LCP1 (0.36)</u>
	Disulfide oxidoreductase activity	PDIA3 (0.46), <u>PGK1 (0.39)</u> , <u>TXNDC12 (0.49)</u>
	Response to interleukin-7	<u>ATIC (3.05)</u> , <u>HSPD1 (0.24)</u> , PDIA3 (0.46)
Energy production	Gluconeogenesis	<u>C1QTNF3 (0.46)</u> , <u>MDH1 (0.49)</u> , <u>MDH2 (0.10)</u> , <u>PGK1 (0.39)</u> , <u>TPI1 (0.23)</u>

ตารางที่ 5 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ซึ่งแบ่งตามกลุ่มของ biological process ซึ่งแสดง symbol protein ของโปรตีนแต่ละชนิด และค่า Log2 ratio ในวงเล็บด้านท้าย โดยโปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ และโปรตีนที่ไม่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ

NG 1 <-> 6		
Process	Biological process	Protein
Protein processing	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	<u>RPL10 (2.05)</u> , <u>RPL10A (2.55)</u> , <u>RPL11 (2.67)</u> , <u>RPL12 (2.77)</u> , <u>RPL13 (2.71)</u> , RPL13A (4.26), RPL15 (2.81), RPL18A (2.12), RPL22 (2.35), RPL23A (3.14), RPL24 (3.32), RPL27 (5.10), <u>RPL31 (3.09)</u> , RPL35 (3.94), <u>RPL4 (2.24)</u> , RPL5 (4.85), RPL6 (2.74), RPL7 (2.43), RPL7A (2.62), <u>RPLP0 (2.20)</u> , <u>RPS11 (2.40)</u> , RPS19 (2.42), <u>RPS23 (2.60)</u> , <u>RPS3 (2.83)</u> , <u>RPS3A (2.09)</u>
	Cytoplasmic translation initiation	<u>EIF3F (2.17)</u> , <u>EIF4A1 (3.02)</u> , RPL13A (4.26)
	Positive regulation of establishment of protein localization to telomere	<u>CCT3 (2.44)</u> , <u>CCT4 (2.05)</u> , <u>CCT7 (2.24)</u>
	Ribosomal small subunit biogenesis	NPM1 (7.17), RPS19 (2.42), XRCC5 (3.74)
	Negative regulation of ubiquitin-dependent protein catabolic process	<u>RPL11 (2.67)</u> , RPL5 (4.85), <u>SDCBP (2.08)</u>
	Purine nucleoside triphosphate biosynthesis process	<u>ATP5F1B (0.29)</u> , IMPDH2 (4.78), <u>PARP1 (4.08)</u>
Cell migration and motility	Arp2/3 complex mediated actin nucleation	<u>ACTR2 (2.04)</u> , <u>ARF1 (2.57)</u> , <u>ARPC2 (2.30)</u> , <u>ARPC3 (3.25)</u>
	Substrate-dependent cell migration	<u>ATP5F1B (0.29)</u> , FN1 (0.48), <u>SDCBP (2.08)</u>
Immune response	Response to interleukin-12	<u>ARF1 (2.57)</u> , <u>PPIA (2.55)</u> , <u>RPLP0 (2.20)</u>
Energy production	Purine nucleoside triphosphate biosynthesis process	<u>ATP5F1B (0.29)</u> , IMPDH2 (4.78), <u>PARP1 (4.08)</u>

NG 1 <-> 6		
Process	Biological process	Protein
DNA repair	Positive regulation of DNA repair	<u>ACTR2 (2.04)</u> , <u>PARP1 (4.08)</u> , <u>RPS3 (2.83)</u>
	Arp2/3 complex mediated actin nucleation	<u>ACTR2 (2.04)</u> , <u>ARF1 (2.57)</u> , <u>ARPC2 (2.30)</u> , <u>ARPC3 (3.25)</u>
Membrane stability	Negative regulation of lipase activity	<u>ANXA1 (2.49)</u> , <u>APOA1 (3.21)</u> , <u>APOC3 (3.43)</u> , <u>VDAC2 (0.43)</u>

ตารางที่ 6 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ซึ่งแบ่งตามกลุ่มของ biological process ซึ่งแสดง symbol protein ของโปรตีนแต่ละชนิด และค่า Log2 ratio ในวงเล็บด้านท้าย โดยโปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ และโปรตีนที่ไม่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ

NG 6 <-> 12		
Process	Biological process	Protein
Protein processing	Cytoplasmic translation	RPL15 (0.45), RPL18A (0.48), RPL19 (0.46), RPL22 (0.48), <u>RPL29 (0.37)</u> , <u>RPL36 (0.23)</u> , RPL6 (0.32)
	Ribosomal large subunit biogenesis	RPL10 (0.43), RPL15 (0.45), RPL35 (0.44), RPL6 (0.32), RPL7 (0.38), RPL7A (0.39), <u>RSL1D1 (0.41)</u>
Cell migration and motility	Peptide cross-linking	FN1 (2.06), <u>KRT2 (5.94)</u> , THBS1 (2.32)

ตารางที่ 7 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนมนุษย์ ในช่วงเวลาทดสอบชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ซึ่งแบ่งตามกลุ่มของ biological process ซึ่งแสดง symbol protein ของโปรตีนแต่ละชนิด และค่า Log2 ratio ในวงเล็บด้านท้าย โดยโปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ และโปรตีนที่ไม่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่พบร่วมกับช่วงเวลาอื่นๆ

NG 12 <-> 24		
Process	Biological process	Protein
Protein processing	Protein targeting to ER	<u>HSPA5</u> (0.22), RPL23A (2.50), RPL24 (3.59), RPL35 (2.41), RPL5 (2.46), RPL6 (2.59), <u>RPLP2</u> (2.63), RPS19 (2.05)
	Protein folding in Endoplasmic reticulum	<u>HSP90B1</u> (0.14), <u>HSPA5</u> (0.22), PDIA3 (0.17)
	IRE-1 mediated unfolded protein response (relate apoptosis)	<u>HSPA5</u> (0.22), <u>PDIA6</u> (0.17), <u>TLN1</u> (0.48)
	Cellular response to calcium ion	<u>CPNE1</u> (0.40), <u>CPNE2</u> (0.13), <u>HSPA5</u> (0.22), <u>NCSTN</u> (0.47)
	Peptide disulfide oxidoreductase activity	<u>P4HB</u> (0.18), PDIA3 (0.17), <u>PDIA6</u> (0.17)
Cell migration and motility	Peptide cross-linking	FN1 (0.15), KRT10 (0.28), THBS1 (0.31)
Cell death	Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	PDIA3 (0.17), <u>PPP2R1A</u> (2.76), <u>PTPRC</u> (0.48), THBS1 (0.31)
	Response to gamma radiation	<u>HSPA5</u> (0.22), <u>PTPRC</u> (0.48), XRCC5 (0.25)
	Neural nucleus development	<u>HSPA5</u> (0.22), <u>YWHAE</u> (0.25), <u>YWHAO</u> (0.19)
Non-category	Platelet degranulation	<u>ACTN1</u> (0.43), <u>FCER1G</u> (0.49), FN1 (0.15), <u>PECAM1</u> (0.31), THBS1 (0.31), <u>TLN1</u> (0.48), <u>TUBA4A</u> (0.10)

4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอมิกส์ของ *N. gonorrhoeae* protein

4.7.1 การวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram

โปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ได้จากการจำแนกด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAK X+ และจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry ในวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) และลดลง (down-regulation) ถูกทำการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram เพื่อวิเคราะห์จำนวนของโปรตีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาต่างๆ ได้ผลการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

แผนภาพ Venn diagram โปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งหมด

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ *N. gonorrhoeae* ที่พบใน EVs ทั้งหมด ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram ดังภาพที่ 37A พบโปรตีนใน EVs ของทั้ง 3 ช่วงเวลา ได้แก่ NG 1_6, NG 6_12 และ NG 12_24 ทั้งหมด 17 ชนิด จากจำนวนโปรตีนทั้งหมดที่พบในช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 6 ที่พบมากถึง 124 ชนิด มีจำนวน 67 ชนิด (54%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้ เท่านั้น จำนวน 57 (46%) ที่พบได้สองช่วงเวลาร่วมกัน คือ ร่วมกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 35 ชนิด และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 39 ชนิด

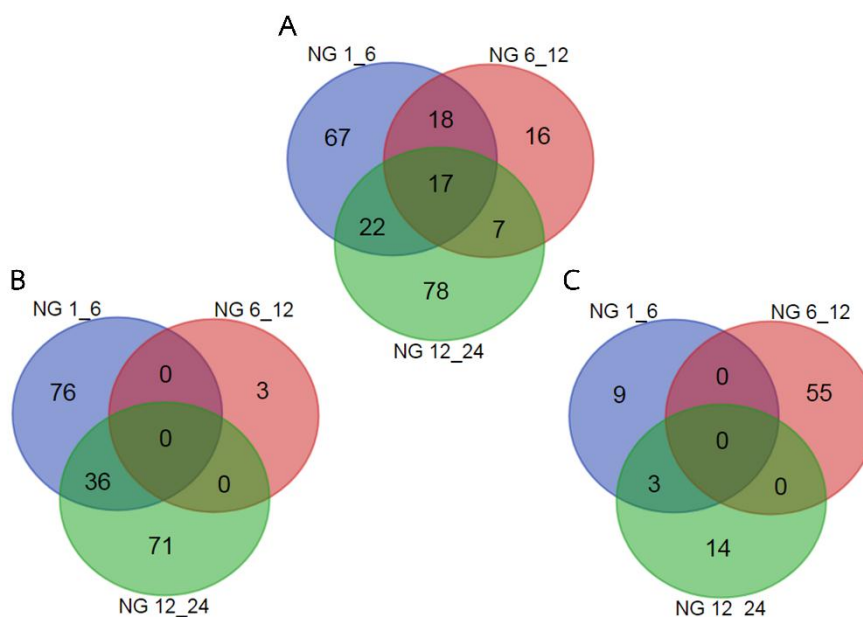
ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 พบโปรตีนจำนวน 58 ชนิด ซึ่งมีจำนวน 16 ชนิด (27.6%) ที่พบเฉพาะในช่วงเวลานี้เท่านั้น และมีโปรตีนที่พบได้สองช่วงเวลาร่วมกัน จำนวน 42 ชนิด (72.4%) คือ ร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 35 ชนิด ดังที่กล่าวไปข้างต้น และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 24 ชนิด

ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 พบโปรตีนมากถึง 124 ชนิด เท่ากับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ซึ่งมีจำนวน 78 ชนิดที่พบในช่วงเวลานี้เท่านั้น (62.9%) และมีโปรตีนที่พบได้สองช่วงเวลาร่วมกัน จำนวน 46 ชนิด (37.1%) คือ ร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 39 ชนิด และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 24 ชนิด ดังที่กล่าวไปข้างต้น

เมื่อนำโปรตีนของเชื้อมาวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อด้วยเทคนิค Label-free quantitative mass spectrometry พบว่ากลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ของแต่ละช่วงเวลาทดสอบมีสองรูปแบบ คือ พบเฉพาะในช่วงเวลานั้นกับพบได้สองช่วงเวลาทดสอบ ดังภาพที่ 37B พบจำนวนโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง จำนวนทั้งหมด 186 ชนิด พบโปรตีนที่พบเฉพาะในช่วงเวลาทดสอบอย่างจำเพาะ จำนวนถึง 150 ชนิด (80.6%) ในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงทั้งหมด 112 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงจำเพาะกับช่วงเวลา จำนวน 76 ชนิด (67.8%) และโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมสองเวลา โดยพบเฉพาะโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เท่านั้น จำนวน 36 ชนิด (32.2%) ในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงทั้งหมดเพียง 3 ชนิด โดยทั้ง 3 ชนิดเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา และในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงทั้งหมดจำนวน 109 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา จำนวน 71 ชนิด (65.1%) และโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมสองเวลา โดยพบเฉพาะโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 36 ชนิด (34.9%) ดังที่กล่าวไปข้างต้น

เช่นเดียวกันกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ดังภาพที่ 37C ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบนั้น พบการแสดงออกสองรูปแบบเช่นกัน โดยพบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งหมดจำนวน 81 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลาเป็นจำนวนถึง 78 ชนิด (96.3%) และพบว่ามีการแสดงออกเช่นเดียวกับกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง กล่าวคือ ในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียง 12 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา จำนวน 9 ชนิด (75%) และโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมสองเวลา โดยพบเฉพาะโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เท่านั้น จำนวน 3 ชนิด (25%)

ในช่วงโมเมนต์ที่ 6 <-> 12 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งหมด 55 ชนิด โดยทั้ง 55 ชนิดเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา และในช่วงโมเมนต์ที่ 12 <-> 24 พบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งหมดจำนวน 17 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา จำนวน 14 ชนิด (82.4%) และโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมสองเวลา โดยพบเฉพาะโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกับช่วงโมเมนต์ที่ 1 <-> 6 จำนวน 3 ชนิด (19.6%) ดังที่กล่าวไปข้างต้น



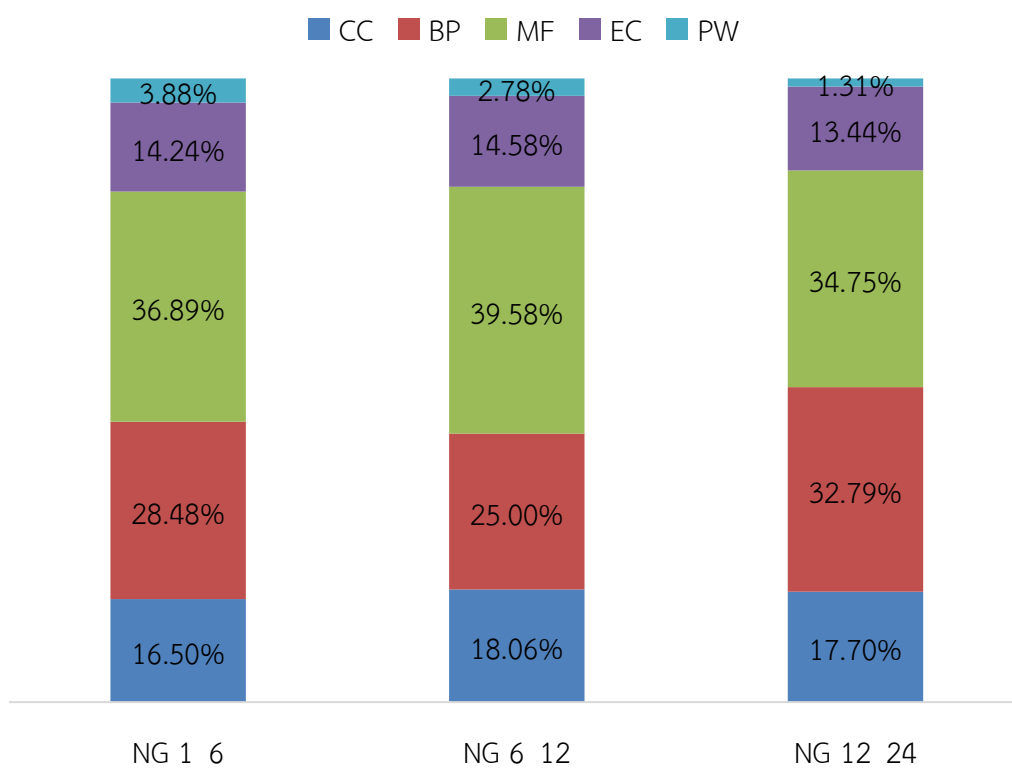
ภาพที่ 37 แผนภาพ Venn-diagram เปรียบเทียบจำนวนของโปรตีนเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งหมดระหว่างช่วงเวลาต่างๆ (A) จำนวนของโปรตีนเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ (B) จำนวนของโปรตีนเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ระหว่างช่วงเวลาต่างๆ (C)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.7.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ (Gene ontology : GO analysis)

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ทั้งหมดที่แยกได้จาก EVs หลังจากวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Uniprot ซึ่งเป็นฐานข้อมูลด้านชีวภาพขนาดใหญ่รวบรวมข้อมูลของโปรตีนและหน้าที่ที่สำคัญ ทำให้ได้ผลของ Gene ontology หรือ GO analysis โดยจำแนกยีนทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ ดังนี้ ช่วงโมเมนต์ที่ 1 <-> 6 (NG 0_1) จำนวน 309 ยีน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบยีนแสดงออกมากที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อเนื่องพบจำนวนยีนที่แสดงออกลดลงเกือบเท่าตัว ดังแสดงในช่วงโมเมนต์ที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) จำนวน 144 ยีน แต่ในภายหลังกการบ่มเชื้อที่ช่วงโมเมนต์ที่ 12 กลับพบว่าจำนวนยีนมีการแสดงออกกลับมาเพิ่มขึ้นอีกครั้งเกือบเท่ากับช่วงโมเมนต์ที่ 1 <-> 6 โดยพบจำนวนยีนในช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 จำนวน 305 ยีน ทั้งนี้เมื่อเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีนตามคุณสมบัติทั้ง 5 ด้าน ได้แก่ องค์ประกอบของเซลล์ (Cellular component: CC) กระบวนการทาง

ชีวภาพ (Biological process: BP) หน้าที่ของเซลล์ในระดับโมเลกุล (Molecular function: MF) กลุ่มของเอนไซม์ (Enzyme class: EC) และ วิถีของเซลล์ (Pathway: PW) เมื่อพิจารณาสัดส่วนของแต่ละคุณสมบัติพบว่ามีความใกล้เคียงกัน มีผลที่น่าสนใจว่ากลุ่มยีนที่พบมากที่สุดในทุกช่วงเวลาทดสอบจะเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ซึ่งมีจำนวนถึง 1 ใน 3 ของยีนที่พบในแต่ละช่วงเวลา ส่วนยีนที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของเซลล์และกลุ่มของเอนไซม์มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา ในการพิจารณาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของค่าสัดส่วนตลอดช่วงการทดสอบ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของเซลล์ หน้าที่ในระดับเซลล์และกลุ่มเอนไซม์ มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และภายหลังการทดสอบที่ชั่วโมงที่ 12 พบว่ายีนมีจำนวนลดลงในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพ พบว่ายีนลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และการแสดงออกของยีนกลับมาเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 โดยเป็นช่วงเวลาที่ยีนมีการแสดงออกสูงสุด สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีพบว่ายีนมีการลดลงตั้งแต่ภายหลังชั่วโมงที่ 6 อย่างต่อเนื่องจนสุดสิ้นการทดสอบในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (ภาพที่ 38)

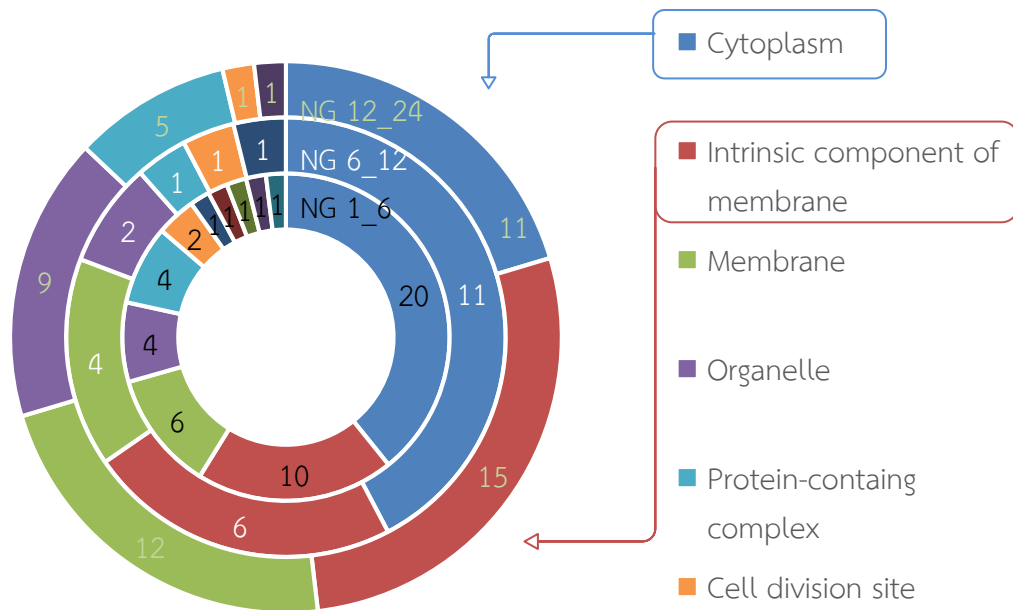


ภาพที่ 38 สัดส่วนของยีนของเชื้อทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24) โดยจำแนกตามคุณสมบัติทั้ง 5 ประการ ได้แก่ CC (Cellular component), BP (Biological process), MF (Molecular function), EC (Enzyme class) และ PW (Pathway)

เมื่อพิจารณาแยกส่วนในแต่ละคุณสมบัติทั้ง 5 ด้าน **องค์ประกอบของเซลล์ (CC)** มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ แบ่งตามโครงสร้างโดยรอบเซลล์ และองค์ประกอบภายในเซลล์ ดังนี้ cytoplasm, intrinsic component of membrane, membrane, organelle, protein-containing complex, nucleoid และ periplasmic space ซึ่งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างเหล่านี้มาน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบ โดยพบสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ถึง 54 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 51 ยีน และพบน้อยสุดที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 26 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละองค์ประกอบพบว่าส่วน cytoplasm พบมากที่สุด โดยเฉลี่ย 32.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในองค์ประกอบของเซลล์ โดยพบยีนแสดงออกมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบถึง 20 ยีน (39.22%) จากยีนทั้งหมดที่พบ 51 ยีนในช่วงเวลาทดสอบนั้น ในขณะที่หลังชั่วโมงที่ 6 จนถึงสิ้นสุดการทดสอบพบยีนแสดงออกจำนวนเท่ากันทั้งในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 เท่ากันช่วงเวลาละ 11 ยีน โดยมีสัดส่วนเท่ากับ 42.31 และ 20.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วน แม้ว่าจะพบจำนวนยีนเท่ากัน 11 ยีนซึ่งลดลงมาเกือบเท่าตัวจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 แต่ในสัดส่วนของชั่วโมงที่ 6 <-> 12 กลับมีสัดส่วนใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 1 <-> 6 องค์ประกอบ intrinsic component of membrane ถูกพบรองลงมาโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 23.66 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวนยีนแสดงออกมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 15 ยีน (27.78%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 10 ยีน (19.61%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 6 ยีน (23.08%) สัดส่วนที่พบมีการเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จนถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 องค์ประกอบที่ถูกพบรองลงมา คือ membrane โดยเฉลี่ยเท่ากับ 16.79 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 12 ยีน (22.22%) รองลงมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 6 ยีน (11.76%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 4 ยีน (15.38%) จากสัดส่วนที่พบจะเห็นว่าสัดส่วนมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่นเดียวกับองค์ประกอบ intrinsic component of membrane ลำดับถัดมาเป็นองค์ประกอบ organelle ที่ถูกพบรองลงมาเฉลี่ย 11.45 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 9 ยีน (16.67%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 4 ยีน (7.84%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 2 ยีน (7.69%) เมื่อสังเกตค่าสัดส่วนพบว่าค่าสัดส่วนสัมพันธ์กับจำนวนยีนที่พบในแต่ละช่วงเวลา โดยเพิ่มขึ้นและลดลงตามจำนวนยีนที่ถูกพบ รองลงมาเป็นองค์ประกอบ protein-containing complex พบเฉลี่ย 7.63 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 5 ยีน (9.26%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 4 ยีน (7.84%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 1 ยีน (3.85%) สัดส่วนที่พบมีลักษณะคล้ายกับสัดส่วนที่พบขององค์ประกอบ organelle จากองค์ประกอบทั้งสี่ องค์ประกอบข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณยีนที่พบเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ มีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และพบขึ้นอีกครั้งในช่วงท้ายของการทดสอบในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนจะเห็นว่าองค์ประกอบ intrinsic component of membrane และ membrane มีสัดส่วนลักษณะเหมือนกัน คือมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จนถึงช่วงท้ายของการทดสอบในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 และองค์ประกอบ organelle และ protein-containing complex มีสัดส่วนในลักษณะที่คล้ายกัน คือ มีการเพิ่มขึ้นและลดลงตามจำนวนยีนที่พบในแต่ละช่วงเวลาโดยมีการลดลงจากชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 12 <-> 24 องค์ประกอบถัดไป ได้แก่

องค์ประกอบ cell division site โดยเฉลี่ย 3.05 เปอร์เซ็นต์ พบการแสดงออกในทุกช่วงเวลาและมีปริมาณยีนที่พบใกล้เคียงกัน แต่พบว่าสัดส่วนมีความแตกต่างกัน โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบยีนจำนวน 2 และ 1 ยีน ตามลำดับ และมีสัดส่วนใกล้เคียงกันเท่ากับ 3.92 และ 3.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบยีนเท่ากับ 1 ยีน แต่มีสัดส่วนลดลงเหลือ 1.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสัดส่วนลดลงกว่าครึ่งหนึ่งของสัดส่วนใน 2 ช่วงเวลาก่อน ดังภาพที่ 39



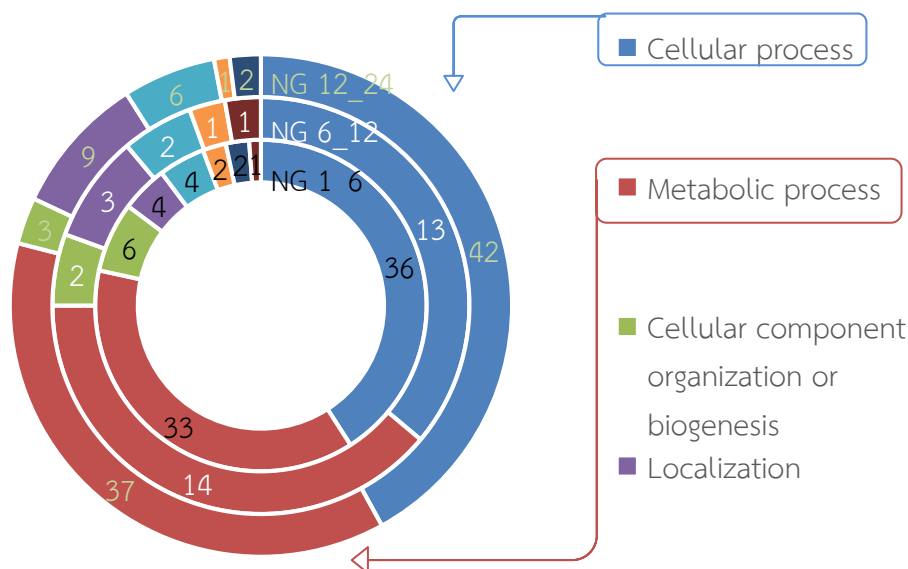
ภาพที่ 39 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อ จำนวน 131 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเซลล์ (CC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

คุณสมบัติด้าน **กระบวนการชีวภาพ (BP)** มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพต่างๆ หลายกระบวนการ ทั้งกระบวนการ cellular process, metabolic process, cellular component organization or biogenesis, localization biological regulation, FtsZ-dependent cytokinesis, response to stimulus และ removal of superoxide radicals ซึ่งพบปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพต่างๆ เหล่านี้มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบเช่นเดียวกันองค์ประกอบของเซลล์ โดยพบสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ถึง 100 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 88 ยีน และพบน้อยสุดที่ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 36 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละกระบวนการชีวภาพพบว่ายีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการในระดับเซลล์ (cellular process) มากที่สุด โดยเฉลี่ย 40.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในกระบวนการชีวภาพ โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบถึง 42 ยีน (42.00%) จากจำนวนยีนทั้งหมดที่พบ 100 โปรตีนในช่วงเวลาทดสอบนั้น รองลงมาเป็นชั่วโมงที่ 1 <-> 6

จำนวน 36 ยีน (40.91%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 13 ยีน (36,11%) เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนพบว่าสัดส่วนในช่วงโม่งที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนแตกต่างจากอีกสองช่วงเวลา แต่มีค่าแตกต่างไม่มากนัก ทั้งๆ ที่จำนวนยีนที่พบลดลงกว่าสามเท่าของจำนวนยีนที่พบสูงสุดของชั่วโมงที่ 12 <-> 24 กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic process) ถูกพบรองลงมาโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.50 เปอร์เซนต์ พบจำนวนยีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 37 ยีน (37.00%) ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 33 ยีน (37.50%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 14 ยีน (38.89%) สัดส่วนมีความใกล้เคียงกันเช่นเดียวกัน แม้ว่าในชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จะพบจำนวนยีนน้อยกว่าช่วงเวลาอื่นมาก จากสองกระบวนการข้างต้นจะเห็นว่า การเพิ่มขึ้นและลดลงของจำนวนยีนรวมถึงสัดส่วนเหมือนกัน กระบวนการ localization ถูกพบรองลงมาโดยเฉลี่ย 7.14 เปอร์เซนต์ โดยพบการแสดงออกสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 9 ยีน (9.00%) รองลงมาชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 4 ยีน (4.55%) ซึ่งใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบยีนจำนวน 3 ยีน (8.33%) สังเกตว่าสัดส่วนในสองช่วงเวลาหลัง ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 24 มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน ในขณะที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 มีสัดส่วนน้อยสุดแต่มีค่าแตกต่างจากสองช่วงเวลาหลัง กระบวนการรองลงมาเป็นกระบวนการ biological regulation โดยเฉลี่ย 5.36 เปอร์เซนต์ มีจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 6 ยีน ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 4 ยีน และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 2 ยีน สัดส่วนของยีนที่พบในช่วงเวลานี้มีค่าใกล้เคียงกัน จากสองกระบวนการข้างต้นจะเห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นและลดลงของยีนในลักษณะเดียวกัน รวมถึงสัดส่วนที่พบก็มีลักษณะเหมือนกัน คือ มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 รองลงมาเป็นกระบวนการ cellular component organization or biogenesis โดยเฉลี่ย 4.91 เปอร์เซนต์ พบจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 6 ยีน (6.82%) รองลงมาได้แก่ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (3.00%) ซึ่งใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 2 ยีน (5.56%) โดยสัดส่วนที่พบจะเห็นว่ามีการลดลงอย่างต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 24 กระบวนการถัดมา กระบวนการ FtsZ-dependent cytokinesis โดยเฉลี่ย 1.79 เปอร์เซนต์ โดยมีการแสดงออกในทุกช่วงเวลาและมีจำนวนยีนที่พบใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 1 <-> 6, ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวนยีน 2 (2.27%), 1 (2.78%) และ 1 (1.00%) ยีน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยกระบวนการที่น่าสนใจ ได้แก่ กระบวนการ response to stimulus เฉลี่ย 1.79 เปอร์เซนต์ โดยพบการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 2 ยีน (2.27%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 2 ยีนเท่ากัน (2.00%) และกระบวนการ removal of superoxide radicals เฉลี่ย 0.89 เปอร์เซนต์ โดยพบยีนที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 ช่วงเวลาละ 1 ยีน เท่ากัน โดยมีสัดส่วนเท่ากับ 1.14 และ 2.78 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 40

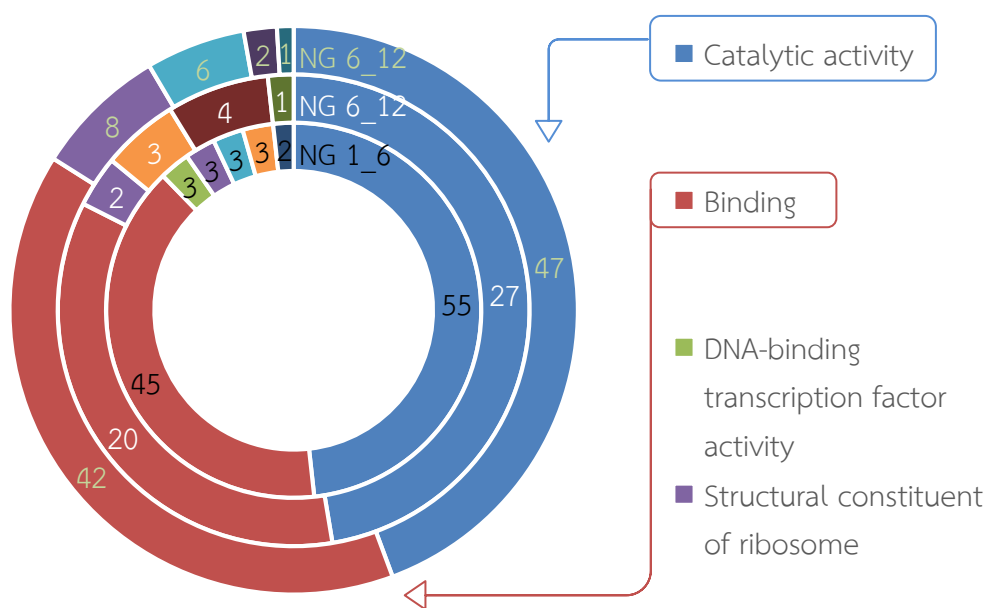


ภาพที่ 40 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อ จำนวน 224 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านกระบวนการชีวภาพ (BP) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24)

คุณสมบัติด้าน **หน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF)** มียีนเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุลต่างๆ หลายหน้าที่ อาทิเช่น catalytic activity, binding, DNA-binding transcription factor activity, structural constituent of ribosome, transporter activity antioxidant และ transmembrane transporter activity โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้มากน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบเช่นเดียวกัน โดยพบสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 114 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 106 ยีน และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 เหลือเพียงจำนวน 57 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละหน้าที่ในระดับโมเลกุล พบว่าเกี่ยวข้องกับหน้าที่ catalytic activity มากที่สุดในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 46.57 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบว่าเกี่ยวข้องกับหน้าที่ในระดับโมเลกุล โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวนถึง 55 ยีน (48.25%) จากยีนทั้งหมด 114 โปรตีนที่พบในช่วงเวลานั้น ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบรองถัดมาจำนวน 47 ยีน (44.34%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวน 27 ยีน (47.37%) เมื่อพิจารณาพบว่าจำนวนยีนที่ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จะลดลงมากกว่าครึ่งของชั่วโมงที่ 1 <-> 6 แต่สัดส่วนมีความแตกต่างกันน้อยมาก และพบว่าสัดส่วนมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จนถึงชั่วโมงที่ 12 <-> 24 หน้าที่ binding ถูกพบรองลงมาเฉลี่ย 38.63 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 45 ยีน (39.47%) ถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 47 ยีน (39.62%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 20 ยีน (35.08%) เห็นได้ว่าลักษณะการเพิ่มและลดลงของยีนมีลักษณะคล้ายกับหน้าที่ catalytic activity เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนพบว่ามี ความแตกต่างกัน โดยพบว่าสัดส่วนชั่วโมงที่ 1 <-> 6 กับชั่วโมงที่ 12 <-> 24 ใกล้เคียงกันและชั่วโมง

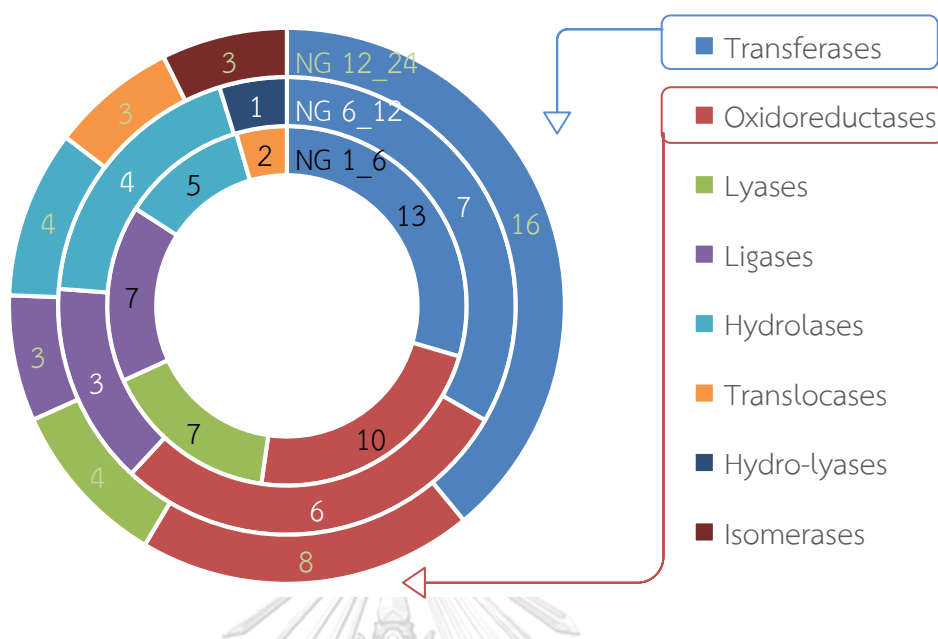
ที่ 6 <-> 12 มีสัดส่วนต่ำที่สุด หน้าที่ถัดมาได้แก่ หน้าที่ structural constituent of ribosome โดยเฉลี่ย 4.69 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยีนสูงสุดในช่วงทำการทดสอบ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 8 ยีน (7.55%) โดยในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 พบจำนวนยีนใกล้เคียงกัน เท่ากับ 3 ยีน (2.63%) และ 2 ยีน (3.51%) ตามลำดับ ในส่วนของสัดส่วนที่พบนั้นมีสัดส่วนสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นและลดลงของยีน นอกจากนี้ยังพบหน้าที่อื่นๆ เช่น หน้าที่ transporter activity พบเฉลี่ย 3.25 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการแสดงออกเพียง 2 ช่วงเวลา ในช่วงทำการทดสอบ ชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 6 ยีน (5.66%) และช่วงต้นของการทดสอบ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบจำนวน 3 ยีน (2.63%) หน้าที่ translation factor activity, RNA binding พบเฉลี่ย 2.17 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวนยีนเพียงสองเวลาเช่นกัน โดยพบที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวนยีนเท่ากัน ช่วงเวลาละ 3 ยีน โดยมีสัดส่วนเท่ากับ 2.63 และ 5.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหน้าที่ transmembrane transporter activity ที่พบเฉลี่ย 1.44 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการแสดงออกช่วงเวลาเดียว คือ ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 4 ยีน (7.02%) ดังภาพที่ 41



ภาพที่ 41 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อ จำนวน 277 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านหน้าที่ในระดับโมเลกุล (MF) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24)

คุณสมบัติด้าน **กลุ่มเอนไซม์ (EC)** มียีนที่มีคุณสมบัติเหมือนกันถูกจัดกลุ่มเป็นกลุ่มเอนไซม์หลายกลุ่ม อาทิเช่น transferase, oxidoreductase, lyases, ligases, hydrolase และ translocases โดยพบโปรตีนที่ถูกจัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้เล็กน้อยแตกต่างกันตามช่วงเวลาทดสอบเช่นเดียวกัน โดยพบสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 ถึง 44 ยีน ลำดับถัดมาเป็นชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวน 41 ยีน และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 21 ยีน

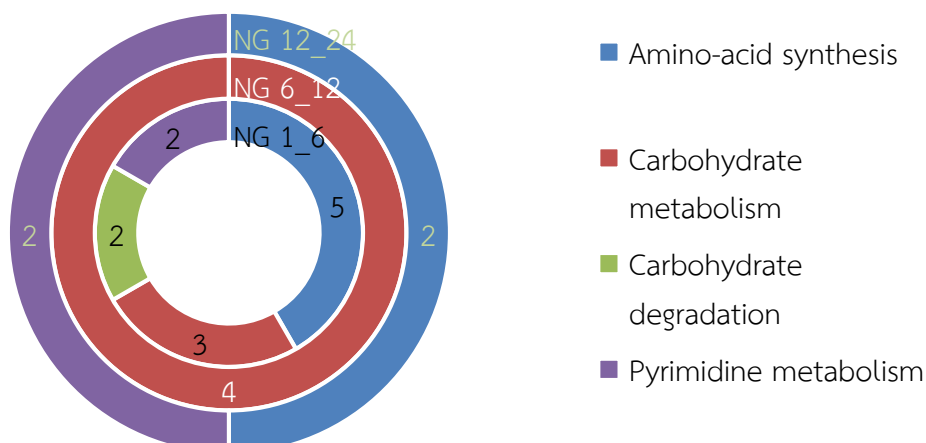
เมื่อพิจารณาแต่ละกลุ่มเอนไซม์ พบว่ากลุ่มเอนไซม์ transferases มีจำนวนยีนมากที่สุดในทุกช่วงการทดสอบโดยเฉลี่ย 33.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนยีนทั้งหมดที่พบในการจัดกลุ่มเอนไซม์ โดยพบจำนวนยีนมากที่สุดที่ช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 จำนวน 16 ยีน (39.02%) ถัดมาเป็นช่วงโมเมนต์ 1 <-> 6 จำนวน 13 ยีน (29.55%) และช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 จำนวน 7 ยีน (33.33%) เมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วน พบว่าแม้ว่าช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 จะมีจำนวนยีนน้อยกว่าเกือบเท่าตัวของอีกสองช่วงเวลา แต่พบว่าค่าสัดส่วนไม่แตกต่างกันมากนัก และค่าสัดส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ช่วงโมเมนต์ 1 ถึงช่วงโมเมนต์ 24 กลุ่มเอนไซม์ oxidoreductase ถูกพบรองลงมาเฉลี่ย 22.64 เปอร์เซ็นต์ พบการแสดงออกสูงสุดที่ช่วงโมเมนต์ 1 <-> 6 จำนวน 10 ยีน (22.73%) ช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 จำนวน 8 ยีน (19.51%) และช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 จำนวน 6 ยีน (28.57%) แม้ว่าจำนวนยีนที่พบมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่พบว่าค่าสัดส่วนของช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 สูงที่สุดแต่ค่อนข้างแตกต่างจากอีกสองช่วงเวลามาก กลุ่มเอนไซม์ถัดมาได้แก่ กลุ่ม ligases และ hydrolase โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.26 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มเอนไซม์ ligases พบจำนวนยีนสูงสุดที่ช่วงโมเมนต์ 1 <-> 6 จำนวน 7 ยีน (15.91%) ช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 และช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 มีจำนวนยีนเท่ากันเท่ากับ 3 ยีน และมีสัดส่วนเท่ากับ 14.29 และ 7.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าจะมีจำนวนยีนเท่ากันแต่ค่าสัดส่วนมีความแตกต่างกันกว่าเท่าตัว และค่าสัดส่วนมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจากช่วงโมเมนต์ 1 ถึงช่วงโมเมนต์ 24 กลุ่มเอนไซม์ hydrolase มียีนสูงสุดในช่วงโมเมนต์ 1<->6 จำนวน 5 ยีน (11.36%) ช่วงโมเมนต์ 6 <-> 12 และช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 มีจำนวนยีนเท่ากันเท่ากับ 4 ยีน และมีสัดส่วนเท่ากับ 19.05 และ 9.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนยีนที่มีการเพิ่มและลดลงมีลักษณะเหมือนกับกลุ่มเอนไซม์ ligases แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนพบว่าในกลุ่มเอนไซม์ hydrolases แต่ละช่วงเวลามีสัดส่วนแตกต่างกันมาก นอกจากนี้ยังพบกลุ่มเอนไซม์อื่นๆ เช่น กลุ่มเอนไซม์ lyases พบเฉลี่ย 10.38 เปอร์เซ็นต์ โดยพบยีนเพียง 2 ช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงโมเมนต์ 1 <-> 6 จำนวน 7 ยีน (15.91%) และช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 จำนวน 4 ยีน (9.76%) กลุ่มเอนไซม์ translocases พบเฉลี่ย 4.72 เปอร์เซ็นต์ พบยีนเพียง 2 ช่วงเวลาเช่นกัน โดยพบที่ช่วงโมเมนต์ 1 <-> 6 จำนวน 2 ยีน (4.55%) และช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (7.32%) และกลุ่มเอนไซม์ isomerases พบเฉลี่ย 2.83 เปอร์เซ็นต์ พบการแสดงออกเพียงช่วงเวลาเดียวที่ช่วงโมเมนต์ 12 <-> 24 จำนวน 3 ยีน (7.32%) ดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อ จำนวน 106 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านกลุ่มเอนไซม์ (EC) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24)

คุณสมบัติด้าน **วิถี (PW)** พบว่ามียีนเกี่ยวข้องกับวิถีต่างๆ ของเซลล์หลายวิถีและมีความหลากหลายในแต่ละช่วงเวลาทดสอบเช่นเดียวกัน จำนวน 4 วิถี ได้แก่ amino-acid synthesis, carbohydrate metabolism, carbohydrate degradation และ pyrimidine metabolism โดยพบยีนสูงสุดชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 12 ยีน ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวนยีนเท่ากัน ช่วงเวลาละ 4 ยีน

เมื่อพิจารณาแต่ละวิถีที่พบ จากการเปรียบเทียบร่วมกันในแต่ละช่วงเวลาทั้ง 3 ช่วงเวลา พบว่าวิถี amino-acid synthesis และ carbohydrate metabolism พบยีนสูงสุดเท่ากัน เฉลี่ยวิถีละ 35 เปอร์เซ็นต์ ในวิถี amino-acid synthesis พบยีนในสองช่วงเวลา ในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 พบยีนจำนวน 5 ยีน (41.67%) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 พบจำนวน 2 ยีน (50%) และในวิถี carbohydrate metabolism พบยีนสองช่วงเวลาเช่นเดียวกัน โดยพบที่ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 3 ยีน (25.00%) และชั่วโมงที่ 6 <-> 12 จำนวน 4 ยีน (100%) รองถัดมาเป็นวิถี pyrimidine metabolism พบเฉลี่ย 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการแสดงออกสองช่วงเวลา ได้แก่ ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จำนวนยีนที่พบเท่ากันช่วงเวลาละ 2 ยีน และมีสัดส่วนเท่ากับ 16.67 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และวิถีสุดท้าย วิถี carbohydrate degradation พบเฉลี่ย 10 เปอร์เซ็นต์ โดยพบยีนเพียงช่วงเวลาเดียว ในชั่วโมงที่ 1 <-> 6 จำนวน 2 ยีน (16.67%) ดังภาพที่ 43



ภาพที่ 43 สัดส่วนและจำนวนของยีนของเชื้อ จำนวน 20 ยีน ที่แสดงคุณสมบัติด้านวิถี (PW) ที่จำแนกตามโครงสร้างในแต่ละช่วงเวลาทดสอบ 3 ช่วงเวลา ชั่วโมงที่ 1 <-> 6 (NG 1_6) ชั่วโมงที่ 6 <-> 12 (NG 6_12) และชั่วโมงที่ 12 <-> 24 (NG 12_24)

4.8 การวิเคราะห์หาตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein marker candidate analysis) ของโปรตีน *N. gonorrhoeae*

จากการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram ของโปรตีนของเชื้อทั้งหมดที่พบในแต่ละช่วงเวลา จะเห็นได้ว่าจะสามารถแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกพร้อมกันทั้ง 3 ช่วงเวลา เป็นโปรตีนที่พบการแสดงออกใน EVs ทั้ง 3 ช่วงเวลา โดยอาจใช้โปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการตรวจสอบการติดเชื้อภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ และกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในแต่ละช่วงเวลา เป็นโปรตีนที่พบการแสดงออกใน EVs เฉพาะในช่วงเวลานั้นๆ โดยอาจใช้โปรตีนนี้เป็นโปรตีนบ่งชี้ถึงความสามารถของเชื้อในการดำเนินไปของโรค

4.8.1 โปรตีนที่มีการแสดงออกพร้อมกัน (All-time course protein candidate)

จากการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram พบโปรตีนที่มีการแสดงออกพร้อมกันทั้ง 3 ช่วงเวลา ทั้งชั่วโมงที่ 1 <-> ชั่วโมงที่ 6 ชั่วโมงที่ 6 <-> ชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 12 <-> ชั่วโมงที่ 24 จำนวน 17 ชนิด ดังตารางที่ 8 ซึ่งอาจใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้ตรวจการติดเชื้อภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ ดังตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาถึงการทำหน้าที่ของโปรตีนที่พบนั้น จะเห็นว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกพร้อมกันเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนมากที่สุด (Translation, ribosomal structure and biogenesis) รองลงมาเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดอะมิโน (Amino acid transport and metabolism) การต่อสู้กับกลไกต่อต้านเชื้อของเซลล์เจ้าบ้าน (Defense mechanism) และการสังเคราะห์พลังงาน (Energy production and conversion) การพบกลุ่มโปรตีนดังกล่าวทั้ง 3 ช่วงเวลา บ่งชี้ว่าเชื้อมีการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน

เมื่ออยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจเพื่อต่อต้านการทำลายจากกลไกต่อต้านเชื้อของเซลล์ โดยมีการแสดงออกของโปรตีนสูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 นอกจากนี้ยังพบว่าในช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 นั้น โปรตีน type IV pilus secretion PilQ ซึ่งเป็นโปรตีนปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *N. gonorrhoeae* โดยเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเกาะติดและการป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน โดยเชื้อสามารถปรับเปลี่ยนการแสดงออกของโปรตีนให้มีหลายรูปแบบ เพื่อป้องกันการจับจากแอนติบอดีของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ตารางที่ 8 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ของโปรตีนเชื้อที่แสดงออกที่เวลาร่วมกันทั้งสามช่วงเวลา โดยแสดงรายละเอียดของโปรตีนและค่า log2 ratio ทั้งสามช่วงเวลา

UniParc accession	Gene symbol	Protein name	COG Categories	ช่วงเวลา 1 <-> 6	ช่วงเวลา 6 <-> 12	ช่วงเวลา 12 <-> 24
UPI00064C77EC	<i>pilQ</i>	type IV pilus secretin PilQ	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	0.36	7.19	0.28
UPI00065A0D35	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA synthetase	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.35	4.61	0.17
UPI0001AF61E1	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit	Amino acid transport and metabolism	0.33	4.24	0.18
UPI0005E52096	<i>mtrD</i>	multidrug efflux RND transporter permease subunit	Defense mechanisms	0.26	3.37	0.11
UPI0001AF7E7E	<i>pntA</i>	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	Energy production and conversion	0.3	3.18	0.27
UPI00064C54D3	<i>metE</i>	5-methyl-tetrahydropteroyl tri-glutamate--homocysteine S-methyltransferase	Amino acid transport and metabolism	0.37	2.79	0.17
UPI00004CE839	<i>tufA_2</i>	Elongation factor Tu	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.3	2.65	0.3

UniParc accession	Gene symbol	Protein name	COG Categories	ช่วงเวลา 1 <-> 6	ช่วงเวลา 6 <-> 12	ช่วงเวลา 12 <-> 24
UPI00019A893B	<i>aspS</i>	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) Ligase	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.3	2.58	0.29
UPI00000C45E7	<i>Efp</i>	Elongation factor P	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.32	2.52	0.31
UPI00017952C9	<i>erpA</i>	Putative iron-sulfur cluster insertion protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	0.39	2.48	0.26
UPI000179533E	<i>ftsZ</i>	Cell division protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0.23	2.48	0.37
UPI00004CE565	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	Energy production and conversion	0.33	2.46	0.45
UPI0001AF5BA7	<i>F0T11_12840</i>	Glycine--tRNA ligase subunit beta	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.27	2.37	0.16
UPI00004CE45B	<i>F0T10_03385</i>	30S ribosomal protein S1	Translation, ribosomal structure and biogenesis	0.31	2.36	0.27
UPI00004CE5B6	<i>tktA</i>	Transketolase	Carbohydrate transport and metabolism	0.46	2.24	0.34
UPI000012DBD6	<i>Adk</i>	Adenylate kinase	Nucleotide transport and metabolism	0.37	2.09	0.21
UPI000179565A	<i>emrA</i>	Multidrug export protein EmrA	Defense mechanisms	0.35	2.03	0.34

*ระดับสีของค่า log₂ ratio โดยสีแดงแสดงถึงค่า log₂ ratio สูง โดยความเข้มของสีแดงแสดงถึงค่า log₂ ratio ที่สูงขึ้น และสีเขียวแสดงถึงค่า log₂ ratio ต่ำ โดยความเข้มของสีเขียวแสดงถึงค่า log₂ ratio ที่ต่ำลง

4.8.2 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะกับช่วงเวลา (Specific-time course protein candidate)

จากการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพ Venn diagram พบโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 และช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 โดยโปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ซึ่งอาจใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้ถึงการดำเนินไปของโรคในการติดตามการติดเชื้อภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ เมื่อพิจารณาถึงการทำหน้าที่ของโปรตีนที่พบนั้น ตามตารางที่ 9-11 จะเห็นว่าในช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 กลุ่มของโปรตีนที่พบมากที่สุดเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกับกลุ่มของโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกันและพบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น บ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อเริ่มกระบวนการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ช่วงเวลาหลังการติดเชื้อเพียง 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ทำหน้าที่อื่นๆ ยังคงเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง ในช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 โปรตีนที่พบและมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมและการสังเคราะห์ผนังของเซลล์ บ่งชี้ว่าในช่วงเวลานี้เชื้อมีการเพิ่มปริมาณ ซึ่งสัมพันธ์กับผลการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ที่พบการเพิ่มขึ้นของความค่าฟลูออเรสเซนต์ของเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์หลังชั่วโมงที่ 6 และช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 ยังพบโปรตีนในการสังเคราะห์โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น แต่พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน ปัจจัยก่อโรค การเคลื่อนที่ของเซลล์ การสังเคราะห์พลังงานและเมตาบอลิซึม บ่งชี้ว่าภายหลังการเพิ่มปริมาณในช่วงเวลาก่อนหน้านี้ เชื้อได้เพิ่มการสังเคราะห์ปัจจัยก่อโรคและการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งอาจบ่งบอกถึงความต้องการของเชื้อในการแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่นๆ ในร่างกาย

ตารางที่ 9 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 จัดกลุ่มตามหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง โปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation)

NG 1 <-> 6		
Category	Function	Protein
Cellular process and signaling	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	- Lon protease (0.36), - Glutathione amide-dependent peroxidase (0.34), - Glutathione S-transferase, N-terminal domain protein (0.45)
	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	- UTP--glucose-1-phosphate uridylyl transferase (0.41), - Efflux transporter, RND family, MFP subunit (0.40), - UDP-N-acetyl muramate--L-alanine ligase (0.40), - Bifunctional protein GImU (0.41), Carboxypeptidase (0.49)
	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	- Cell division protein FtsA (0.33), GTPase Obg (0.35)
	Cell motility	- Twitching mobility protein (0.29), - Chromosome partitioning protein ParA (0.26)

NG 1 <-> 6		
Category	Function	Protein
Information storage and processing	Translation, ribosomal structure and biogenesis	<ul style="list-style-type: none"> - Ribosome-binding ATPase YchF (0.33), - 50S ribosomal protein L18 (0.48), - 50S ribosomal protein L20 (2.27), - 30S ribosomal protein S8 (0.49), - <u>Transcriptional regulator MraZ (2.56),</u> - 50S ribosomal protein L25 (0.46), - Cysteine--tRNA ligase (0.45), - Glutamate--tRNA ligase (0.23), - Methyltransferase (0.43), - Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H (0.37), - Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit (0.48), - 23S rRNA (Pseudouridine(1915)-N(3))-methyltransferase RlmH (0.49)
Information storage and processing	Replication, recombination and repair	<ul style="list-style-type: none"> - <u>DNA-binding protein HU-beta (2.43),</u> Protein RecA (0.30)
	Transcription	<ul style="list-style-type: none"> - HTH-type transcriptional regulator DmlR (0.23), - Phage associated protein (0.41), - Hydrogen peroxide-inducible genes activator (0.31), - Transcription termination factor Rho (0.30)
Metabolism	Energy production and conversion	<ul style="list-style-type: none"> - 3-isopropylmalate dehydrogenase (0.28), - D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain protein (0.39), - Cytochrome c oxidase accessory protein CcoG (0.34), - Cytochrome (0.42), NAD(P)H nitroreductase (0.31), - Ferredoxin--NADP reductase (0.33), - Electron transfer flavoprotein subunit beta (0.40)
	Amino acid transport and metabolism	<ul style="list-style-type: none"> - Indole-3-glycerol phosphate synthase (0.31), - 3-isopropylmalate dehydratase small subunit (0.30)
	Carbohydrate transport and metabolism	<ul style="list-style-type: none"> - Glucose-6-phosphate isomerase (0.45), - 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (0.35)
	Coenzyme transport and metabolism	<ul style="list-style-type: none"> - Lipoyl synthase (0.28), - S-adenosylmethionine synthase(0.37)
	Lipid transport and metabolism	<ul style="list-style-type: none"> - 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (0.42)
Poorly characterized	General function prediction only	<ul style="list-style-type: none"> - Energy-dependent translational throttle protein EttA (0.31)

ตารางที่ 10 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 จัดกลุ่มตามหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง โปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation)

NG 6 <-> 12		
Category	Function	Protein
Cellular process and signaling	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	- <u>D-alanine--D-alanine ligase (5.02)</u> , - <u>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC (2.82)</u>
Information storage and processing	Transcription	- Helix-turn-helix transcriptional regulator (0.29)
Metabolism	Energy production and conversion	- <u>Cytochrome c1 (3.10)</u> , - <u>Citrate synthase (2.41)</u>
	Amino acid transport and metabolism	- <u>Sodium/proline symporter (2.28)</u>
	Inorganic ion transport and metabolism	- <u>Nitric oxide reductase (3.24)</u>
Poorly characterized	General function prediction only	- <u>ABC transporter ATP-binding protein uup (2.37)</u>

ตารางที่ 11 ตัวแทนโปรตีนบ่งชี้ (protein markers) ของโปรตีนเชื้อ ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 จัดกลุ่มตามหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง โปรตีนที่ขีดเส้นใต้คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation)

NG 12 <-> 24		
Category	Function	Protein
Cellular process and signaling	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	- <u>Cell-binding factor (4.44)</u> , - 10 kDa chaperonin(0.42), - Putative protease SohB (0.39), - <u>Cytochrome c551 peroxidase (0.44)</u>
	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	- <u>Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] (0.24)</u> , - <u>Mechanosensitive ion channel family protein (0.44)</u> , - <u>Outer-membrane lipoprotein LolB (2.21)</u> , - dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (0.29), - ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (0.37), - DD-transpeptidase (0.42), - Membrane protein insertase YidC (0.34)
	Cell motility	- <u>Formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfG (3.45)</u> , - PilG(0.40), - Twitching mobility protein (0.36), - PilT (0.45)
	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	- <u>Biopolymer transport ExbD/TolR family protein (2.05)</u> , - Signal peptidase I (0.44)

NG 12 <-> 24		
Category	Function	Protein
Cellular process and signaling	Signal transduction mechanisms	- Carbon starvation protein A (0.34), - Crp-like helix-turn-helix domain protein (0.49)
Information storage and processing	Translation, ribosomal structure and biogenesis	- 30S ribosomal protein S7 (3.70), - 50S ribosomal protein L9 (0.47), - Lysine--tRNA ligase (0.23), - 50S ribosomal protein L5 (0.48), - 30S ribosomal protein S10 (0.48), - Elongation factor Ts (0.45), - 30S ribosomal protein S16 (2.27), - 50S ribosomal protein L6 (0.49), - 50S ribosomal protein L17 (2.03)
	Replication, recombination and repair	- Single-stranded DNA-binding protein (2.29), - DNA gyrase subunit A (0.29)
	Transcription	- DNA-binding response regulator (0.30), - Transcription antitermination protein NusB (0.07), - DNA-directed RNA polymerase subunit beta (0.40), - Transcription termination/antitermination protein NusG (0.39)
Metabolism Metabolism	Energy production and conversion	- Lactate utilization protein C (0.35), - Dihydrolipoyl dehydrogenase (2.03), - ATP synthase subunit a (0.33), - ATP synthase subunit beta (0.36), - Acetate kinase (0,33), - Inorganic pyrophosphatase (0.48), - Azurin (0.33)
	Amino acid transport and metabolism	- Amino acid carrier family protein (0.21), - Branched-chain-amino-acid transaminase (0.44), - - 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyl transferase (0.30)
	Carbohydrate transport and metabolism	- Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (0.32), - - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (0.40)
	Coenzyme transport and metabolism	- ABC transporter periplasmic binding, thiB subfamily protein (4.17)
	Inorganic ion transport and metabolism	- ABC transporter periplasmic binding protein (6.38), - - ABC transporter ATP-binding protein (0.43)
	Lipid transport and metabolism	- 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 (0.15), - - Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (0.48)
Poorly characterized	General function prediction only	- Class II glutamine amido-transferase (0.42)
	Function unknown	- DUF502 domain-containing protein (0.33), - Secreted protein (0.45)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกบรรจุภายใน EVs ในการใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้ มีการศึกษาจำนวนมากในโรคมะเร็ง (169, 170) และโรคไต (171, 172) โดยพบว่าการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเป็นมะเร็งและภาวะที่ผิดปกติของไตได้ ในการศึกษาของโรคติดเชื้อนั้นยังคงมีจำนวนการศึกษาน้อย แม้ว่าจะมีการศึกษาพบการบรรจุโปรตีนของเชื้อจุลชีพภายในถุง EVs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่มีการติดเชื้อ ซึ่งสามารถใช้โปรตีนเหล่านั้นเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการตรวจการติดเชื้อได้ (23) แต่ในการศึกษาของโรคติดเชื้อแบคทีเรีย พบเฉพาะการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการติดเชื้อวัณโรค (29, 30) เท่านั้น ทั้งนี้การศึกษาของเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีเฉพาะการศึกษาในด้านบทบาทของ EVs ต่อเซลล์ โดยเป็นการศึกษาการปรับเปลี่ยนกระบวนการอะพอพโทซิสในการติดเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกเท่านั้น (25) การศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนภายในถุง EVs ทั้งในส่วนของโปรตีนของมนุษย์และของเชื้อ ในการใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้ของการวินิจฉัยการติดเชื้อหนองใน รวมถึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่ระยะเวลาของการติดเชื้อที่แตกต่างกัน ตามสมมุติฐานจากการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนภายในถุง EVs มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก เมื่อระยะเวลาของการติดเชื้อดำเนินไป (23) เพื่อเพิ่มความสามารถในการใช้วินิจฉัยตรวจสอบระยะต่างๆ เมื่อเกิดการติดเชื้อ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจสามารถเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ opsonization โดยสามารถสังเกตเห็นเชื้อภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจได้ตั้งแต่ 30 นาทีแรกของการทดสอบ จนถึงเวลาที่ 21 ชั่วโมง 30 นาที นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจเมื่อระยะเวลาการติดเชื้อดำเนินไป ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจได้ (88) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ของเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจที่ทำการบ่มร่วมกันที่ช่วงเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ โดยทำการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์แยกกลุ่มของเชื้อที่พบภายนอกและภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจเช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้น แต่ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดสอบสามารถสังเกตเห็นเชื้อภายในเซลล์ได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดสอบจนถึงสิ้นสุดการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจสามารถเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส และเกิดการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ภายในเซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการหาค่าความเข้มข้นของสีฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อภายในเซลล์ โดยพบการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มข้นของแสง

ฟลูออเรสเซนซ์หลังชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 24 อย่างไรก็ตามจากผลข้างต้นไม่สามารถสรุปได้ว่าในการทดสอบครั้งนี้เชื้อที่อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจมีการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ เนื่องจากไม่มีการยับยั้งกระบวนการฟาโกไซโทซิสภายหลังเกิดการฟาโกไซโทซิสหรือทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ และการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ แต่มีการศึกษาอื่นๆ ที่รายงานพบว่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* สามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจภายหลังเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสได้ (18, 88, 173)

คณะผู้วิจัยได้ทำการปั่นแยกถุง EVs จากน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วยการใช้เทคนิค ultracentrifuge ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดในการปั่นแยกถุง EVs เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ เช่น density gradient, filtration, size exclusion chromatography และ precipitation (174) เนื่องจากเทคนิค ultracentrifuge จัดเป็นเทคนิคมาตรฐาน (gold standard) (175) และเหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณมากรวมถึงเป็นเทคนิคที่ไม่มีการเติมสารเคมีอื่นๆ เพิ่มเติมในระหว่างกระบวนการ (176) ในขณะเดียวกันการศึกษาวิจัยถุง EVs จำเป็นต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนของถุง EVs จาก FBS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากภายในถุง EVs ของ FBS มีการบรรจุโปรตีนของวัวเช่นเดียวกัน ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ได้ โดยทั่วไปเทคนิคที่นิยมใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนโปรตีนดังกล่าวนิยมใช้ด้วยกัน 2 เทคนิค ได้แก่ 1. การปั่นแยก EVs ออกจาก FBS ก่อนนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค ultracentrifuge แต่พบว่าวิธีนี้มีความยุ่งยาก ใช้ระยะเวลาอันยาวนานและไม่สามารถกำจัด EVs ของ FBS ออกทั้งหมดได้ โดยยังคงพบการปนเปื้อนภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการใช้ FBS ที่ทำการแยก EVs ออก ส่งผลทำให้การเจริญและการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง (177, 178) 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติม FBS (FBS-free media) วิธีนี้พบว่ามีความเสี่ยงที่ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเครียดและส่งผลให้ส่วนประกอบที่บรรจุภายในถุง EVs มีการเปลี่ยนแปลงไป (179) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการลดผลกระทบของโปรตีนที่อาจปนเปื้อนมาจากถุง EVs ของ FBS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยการทำการแยก EVs จาก FBS ที่ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการจำแนกโปรตีนภายในถุง EVs ด้วยห้องสมุดโปรตีนมนุษย์ โดยหากโปรตีนที่ได้จากการศึกษาถูกจำแนกเป็นโปรตีนชนิดเดียวกับที่ได้จาก FBS โปรตีนนั้นจะถูกตัดออกจากการศึกษา วิธีนี้จะช่วยลดผลกระทบของการปนเปื้อนของโปรตีนภายในถุง EVs ของ FBS โดยไม่มีผลต่อเซลล์ในระหว่างการทดสอบ ทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาสั้น วิธีการนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดผลกระทบของการปนเปื้อนของโปรตีนจากถุง EVs ของ FBS ในการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์

แม้ว่าการศึกษาก่อนหน้าได้ทำการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อจุลชีพ แต่ยังคงเป็นเพียงการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนของเชื้อจุลชีพเท่านั้น การศึกษาในส่วนของโปรตีนของมนุษย์มีรายงานน้อยมาก โดยพบการศึกษาในเชื้อ *Leishmania* สำหรับการศึกษาในเซลล์ที่ติดเชื้อแบคทีเรียได้มีการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นการศึกษาแรก (180) ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของมนุษย์ภายใน EVs ของเซลล์ที่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ โดยได้สรุปว่าการติดเชื้อ *M. tuberculosis* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ

โปรตีนภายใน EVs เช่นเดียวกับในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยพบความหลากหลายของชนิดโปรตีนของมนุษย์ภายใน EVs จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* เช่นเดียวกับเชื้อ *M. tuberculosis* และได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากการศึกษาก่อนหน้า โดยได้ทำการศึกษาใน 4 ช่วงเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับเชื้อและทำการศึกษาเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantification ซึ่งพบว่าชนิดของโปรตีนที่พบภายใน EVs มีความหลากหลายในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยพบว่าจำนวนของโปรตีนในช่วงแรกของการทดสอบมีจำนวนมากกว่าช่วงหลังของการทดสอบ รวมถึงโปรตีนยังมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน จำนวนของโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมีจำนวนในช่วงแรกมากกว่าช่วงหลังการทดสอบเช่นเดียวกัน และเมื่อทำการสร้างแผนภาพ Venn-diagram เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่พบในแต่ละช่วงเวลา พบโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกันทั้ง 4 ช่วงเวลาเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ fibronectin, 60S ribosomal protein L35 และ 40S ribosomal protein S19 ในขณะที่โปรตีนส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับช่วงเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับเชื้อ ผลการทดสอบนี้จึงบ่งชี้ว่าช่วงเวลาของการบ่มร่วมกับเชื้อที่ช่วงเวลาแตกต่างกันส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายใน EVs โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากปฏิสัมพันธ์ของเชื้อ อันเนื่องมาจากการก่อพยาธิสภาพที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการติดเชื้อ (infection period) (181, 182)

EVs นับว่ามีบทบาทและหน้าที่ในกระบวนการชีวภาพที่หลากหลาย โดยมีบทบาทสำคัญในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-cell communication) ผ่านโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์และสารชีวโมเลกุลที่ถูกบรรจุอยู่ใน EVs ทั้งในส่วนของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิก เนื่องจาก EVs มีการหลั่งจากเซลล์หลายชนิด โดยองค์ประกอบที่พบใน EVs นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่หลั่ง EVs ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (134, 183) และสิ่งเร้าที่มากระตุ้น เช่น การติดเชื้อจุลชีพ (26) เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในเชื้อ *N. gonorrhoeae* คณะผู้วิจัยจึงอาศัยการเทียบเคียงกับผลการศึกษาก่อนหน้าในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv เดียวกัน จำนวน 3 การศึกษาที่ทำการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ภายในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เวลา 4, 12 และ 24 ชั่วโมง พบจำนวนโปรตีนรวมจำนวน 4,868 ชนิด 5,370 ชนิด และ 2,032 ชนิด ตามลำดับ และพบโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 845, 194 และ 61 ชนิด ตามลำดับ (184-186) และเทียบเคียงผลการศึกษาช้างต้นกับการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ภายใน EVs ที่หลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจที่บ่มร่วมกับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนโปรตีนรวม 355 โปรตีน และโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 41 โปรตีน (180) จากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าจำนวนโปรตีนภายในเซลล์มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญอาจบ่งชี้ได้ว่ามีจำนวนลดลงแปรผันตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นและส่งผลให้จำนวนของโปรตีนที่ถูกบรรจุภายใน EVs อาจแปรผันตามระยะเวลาเช่นเดียวกับโปรตีนภายในเซลล์ โดยผลการทดสอบของผู้วิจัยพบการเพิ่มขึ้นและลดลงของโปรตีนที่ถูกบรรจุภายใน EVs ลักษณะเดียวกัน กล่าวคือพบจำนวนโปรตีนภายใน EVs สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 และมีจำนวนลดลงภายหลังชั่วโมงที่ 6 จนสิ้นสุดการทดสอบ อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อระยะเวลาของการติดเชื้อดำเนินไป ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจกับเชื้อลดลง ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนและการบรรจุโปรตีนภายใน EVs ลดลงกว่าช่วงแรกของการติดเชื้อ ในขณะที่เดียวกันหากพิจารณาปริมาณโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นพบว่า มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาของการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้น จึงอาจสรุปได้ว่า

ในช่วงแรกของการติดเชื้อนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นการทำงานให้ทำลายเชื้อภายในเซลล์ ปริมาณของโปรตีนของมนุษย์จึงมีปริมาณสูง แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อ *N. gonorrhoeae* พยายามที่จะอาศัยอยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจ โดยการปรับเปลี่ยนกลไกการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจเพื่อต่อต้านหรือยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ (92)

เนื่องจาก EVs ทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ ผ่านการจับของโปรตีนบนเยื่อหุ้ม EVs และโปรตีนที่บรรจุอยู่ใน EVs กับตัวรับของเซลล์ผู้รับ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนที่ถูกขนส่งบน EVs ด้วยการใช้การวิเคราะห์ Gene ontology ทั้ง 5 ด้าน ได้แก่ cellular component, biological process, molecular function, protein class และ pathway โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของเชื้อ *M. tuberculosis* ข้างต้นและการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีความแตกต่างในด้าน cellular component เพียงเล็กน้อย โดยการศึกษาข้างต้นพบโปรตีนส่วน extracellular region มากที่สุด รองลงมาเป็นส่วนออร์แกเนลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียส ไซโตสเกลิตัน ตามลำดับ เป็นต้น และการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบโปรตีนส่วนออร์แกเนลล์มากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มของโปรตีนที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (protein-containing complex) เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนที่อยู่ในช่องว่างของเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-enclosed lumen) และ extracellular region เมื่อวิเคราะห์ด้าน biological process และ molecular function พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยพบการทำหน้าที่ binding, biological regulation, metabolic process, response to stimulus, multicellular organismal process, developmental process, catalytic activity และ localization เป็นส่วนใหญ่ โดยกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ล้วนเกี่ยวข้องกับบทบาทของ exosomes (187, 188) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของโปรตีนภายในเซลล์ที่ปนเปื้อนกับเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความสอดคล้องเช่นเดียวกัน และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาโปรตีนโอมิคส์ของ exosomes ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (189) จึงอาจสรุปได้ว่า 1. องค์ประกอบของโปรตีนภายใน EVs จากเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อแบคทีเรีย มักเป็นโปรตีนส่วนของออร์แกเนลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และ Extracellular region โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการและหน้าที่ในระดับโมเลกุลข้างต้น 2. คุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนที่พบใน EVs อาจสะท้อนถึงกระบวนการชีวภาพที่กำลังเกิดขึ้นภายในเซลล์แมคโครฟาจที่เกิดการติดเชื้อภายในเซลล์

เป็นที่น่าสังเกตว่าโปรตีนกลุ่ม ribosomal protein ถูกพบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ โดย ribosomal protein นั้นจัดเป็นกลุ่ม translational regulator ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการขนส่งอาร์เอ็นเอ ภายใน exosomes ไปยังเซลล์ผู้รับ โดยการจับกับอาร์เอ็นเอและประกอบเป็นโครงสร้าง RNA-ribonucleoprotein ในการขนส่งอาร์เอ็นเอ เข้าไปใน exosomes และช่วยรักษาสภาพอาร์เอ็นเอ ขณะอยู่ใน exosomes (190) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอาร์เอ็นเอมีผลต่อการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ทั้งในส่วนของการแสดงออกและการทำหน้าที่ของยีน โดยเฉพาะอาร์เอ็นเอ กลุ่ม miRNA ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนกระบวนการของเซลล์ได้หลายกระบวนการ (191) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเกิดการขนส่งไปยังเซลล์ผู้รับ กลุ่มของ ribosomal protein ยังสามารถทำหน้าที่กระตุ้นการผลิตโปรตีนภายในเซลล์ผู้รับได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่า ribosomal protein มีบทบาท

สำคัญต่อการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านอาร์เอ็นเอ ทั้งในส่วนของ การกระตุ้นหรือส่งสัญญาณไปยังวิถีของเซลล์ผู้รับด้วยการทำงานของอาร์เอ็นเอเองรวมถึงวิถีที่เกี่ยวข้องกับ translational regulator โดยตรง (192)

นอกจากนี้ โปรตีน Cytochrome b-245, Lysozyme C, Ras-related protein, Tetraspanin-14, Annexin I และ Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain ที่พบในการศึกษานี้เป็นโปรตีนที่พบใน pro-coagulant microvesicles ซึ่งพบว่ามีบทบาทในการแข็งตัวของเลือดผ่านวิถี extrinsic และ intrinsic รวมถึงบทบาทต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิด innate immunity ในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลชีพ (193) และยังพบกลุ่มของโปรตีนฮีสโตน ได้แก่ Histone 1.5 (H15), Histone H2A.V (H2AV) และ Histone H4 (H4) ร่วมกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของกรานูล ได้แก่ Collagen alpha-1(I) (COL1A) และ Thrombospondin-1 (TSP1) ที่บ่งชี้ถึงการสร้างโครงสร้าง macrophage extracellular trap (MET) (194) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เซลล์แมคโครฟาจปล่อยออกไปสู่ภายนอกเซลล์เพื่อดักจับและทำลายเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งพบการปรากฏของโปรตีนฮีสโตน ซึ่งสามารถกระตุ้นวิถี inflammasome pathway ได้ผ่านทาง Toll-like receptors (TLRs) (195) อีกด้วย

ในการศึกษาก่อนหน้า ในเชื้อ *M. tuberculosis* ได้พบโปรตีนของเชื้อภายใน exosomes จากเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อดังกล่าว รวมถึงการศึกษาในซีรัมจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อวัณโรค ซึ่งพบโปรตีนของเชื้อภายในถุง exosomes เช่นกัน การศึกษาข้างต้นได้พบโปรตีนที่มีคุณสมบัติสำหรับใช้ในการตรวจติดตามติดเชื้อแบบ active tuberculosis (182, 196) ประกอบกับการศึกษาถึงกลไกของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ในการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจเพื่อให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ภายในเซลล์ คณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่าภายใน EVs จากเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* น่าจะมีการบรรจุโปรตีนของเชื้อเป็นส่วนประกอบอยู่เช่นกัน โดยจากการศึกษาได้พบโปรตีนของเชื้อจำนวนหลายชนิดและเป็นองค์ประกอบหลายส่วนของเชื้อ ทั้งส่วนของไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มเซลล์ ออร์แกเนลล์ และ protein-containing complex โดยส่วนของไซโทพลาสซึมพบสัดส่วนมากที่สุด เป็นที่น่าสนใจว่าผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* โดยพบว่าโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ภายใน EVs เป็นโปรตีนที่มีการหลั่งออกมาจากเซลล์ของเชื้อ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ (29) ความแตกต่างขององค์ประกอบภายใน EVs ที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากกลไกในการบรรจุโปรตีนและการสร้างถุง EVs มีกลไกที่ต่างกัน

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า EVs จากเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* บรรจุโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจการติดเชื้อได้ รวมถึงโปรตีนเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งในส่วนของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ผลการศึกษาพบทั้งโปรตีนที่เป็น housekeeping gene ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ได้แก่ โปรตีน adenylate kinase (*adk*) (197) โปรตีนที่เป็น virulence factor โดยพบโปรตีนส่วนของ type IV pili ประกอบด้วยโปรตีน PilG (198) โดยเป็นโปรตีน pili ที่ถูกสร้างจากยีนที่เป็น highly conserve pilus-assembly gene (199) และโปรตีน PilT (200) รวมถึงโปรตีน RegF ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น negative regulator ของการสร้างโปรตีน PilE (201)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ โปรตีน penicillin-binding protein 1 (*ponA*) (202) และ DNA gyrase subunit A (*gyrA*) (203) โดยการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวจะส่งผลให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ เป็นไปได้ว่าโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีนที่กลายพันธุ์นี้อาจสามารถพัฒนาใช้ในการตรวจการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมด้วยได้ ซึ่งยังต้องการการศึกษาต่อไปในอนาคต โปรตีนที่เชื้อสร้างเพื่อใช้ในการป้องกันจากการทำลายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ recombinase A (*RecA*) (204) มีหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายจาก ROS นอกจากนี้ *RecA* ยังคงเป็น housekeeping gene อีกด้วย (197) และ Cytochrome c peroxidase (205) ที่ใช้ในการทำลายฤทธิ์ของ ROS และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) รวมถึงโปรตีน efflux pump membrane transporter D (*mtrD*) (206) โดยเชื้อใช้ในการขับสารต้านจุลชีพออกจากเซลล์ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอื่นๆ เช่น โปรตีน Ton-B dependent transporter ได้แก่ โปรตีน TbpA และ lipoprotein โดยโปรตีนทั้งสองทำงานร่วมกันสำหรับการทำหน้าที่ในการขนส่งเหล็กจากเซลล์เจ้าบ้านเพื่อใช้เป็นสารอาหารในการเจริญของเชื้อ โปรตีนดังกล่าวจึงจัดได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญ (critical factor) สำหรับการมีชีวิตรอดของเชื้อ (207) อีกทั้งโปรตีน TbpA ยังถูกใช้ในการศึกษาเป็นวัคซีนอีกด้วย (208) โปรตีน chaperonin 10 (*groES*) โดยเป็นโปรตีนที่เชื้อใช้ในการ colonization สำหรับเกาะติดเซลล์เยื่อผิว (209) ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการติดเชื้อ โดยโปรตีนนี้ได้ถูกศึกษาและพบว่า เป็น novel immunogenic ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* สำหรับการหา therapeutic agent หรือการพัฒนาวัคซีน (210)

ผลจากการสร้างแผนภาพ protein-protein interaction แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงระหว่างโปรตีนและกระบวนการที่เกี่ยวข้อง ในช่วงเวลาที่ 0 <-> 1 มีโปรตีนบางส่วนสัมพันธ์กับกระบวนการยึดเกาะ (adhesion) ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างหนึ่งในระหว่างที่มีการติดเชื้อ รวมถึงโปรตีนบางส่วนสัมพันธ์กับกระบวนการ aminoglycan catabolism โดยเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารประกอบ aminoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix มีการศึกษาพบว่าในเซลล์แมคโครฟาจที่มีการติดเชื้อวัณโรคพบการเกาะติดของเซลล์แมคโครฟาจเพิ่มขึ้น และการสร้างเอนไซม์ metalloproteinase เพิ่มขึ้น ในการสลายโครงสร้าง extracellular matrix ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์แมคโครฟาจและการอักเสบที่จะทำลายเนื้อเยื่อ (211) นอกจากนี้ยังพบกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง IL-6 และ IL-7 ความสัมพันธ์ของการหลั่ง IL-6 นั้น จากการศึกษาในผู้ป่วยหญิงที่ติดเชื้อหนองใน พบว่ามีความจำเพาะกับการติดเชื้อหนองใน โดยไม่พบการหลั่ง IL-6 ในการติดเชื้อหนองในร่วมกับ *Trichomonas vaginalis* และ *Chlamydia trachomatis* (212) นอกจากนี้ยังพบว่าในการติดเชื้อในผู้ป่วยชายสามารถตรวจพบ IL-6 ในปัสสาวะก่อนมีอาการของโรคแสดง (213) อีกทั้งยังพบว่าการหลั่ง IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อวัณโรคมีความจำเพาะสำหรับการเป็น biomarker ของการติดเชื้อได้ (214) สำหรับบทบาทของ IL-7 ที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อหนองในยังคงไม่แน่ชัด แต่พบว่าการติดเชื้อวัณโรค IL-7 สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเชื้อวัณโรคในหนูที่มีติดการติดเชื้อได้ (215) รวมถึงการพบโปรตีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ gluconeogenesis การศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อวัณโรค พบกระบวนการ carbon flow ของ lactate ในวิถี TCA cycle ซึ่งนำไปสู่กระบวนการ gluconeogenesis และจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นสารประกอบ

phosphoenolpyruvate โดยพบว่ามีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อวัณโรคในเซลล์แมคโคร-ฟาจ (216) สำหรับความสัมพันธ์ของโปรตีนในช่วงเวลา 1 <-> 6 พบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการ arp2/3 complex mediated actin nucleation โดยโปรตีน arp2/3 complex เป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้มีการต่อสายของ actin ได้อย่างรวดเร็ว โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell mobility, phagocytosis และ membrane trafficking นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวยังมีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อ ดังเช่น เชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่าโปรตีน arp2/3 complex กระตุ้นการต่อสายของ actin สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ออกจาก phagosome ไปยังไซโทพลาสซึมของเซลล์ (217) หรือในเชื้อกลุ่ม *Salmonella* พบว่าโปรตีน arp2/3 complex มีบทบาทต่อการบุกรุกเซลล์แมคโครฟาจของเชื้อ โดยผลการศึกษาลงแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน arp2/3 complex มีความทนทานต่อการบุกรุกของเชื้อมากกว่า รวมถึงในเชื้อ *Shigella flexneri* และ *Escherichia coli* โปรตีน arp2/3 complex มีบทบาทต่อการกระตุ้นการยึดเกาะ (attachment) การติดเชื้อภายในเซลล์ (internalization) และการแพร่เชื้อระหว่างเซลล์ (cell-cell spread) (218) นอกจากนี้พบความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ negative regulation of lipase activity โดยในการศึกษาก่อนหน้าพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ lipase activity ในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อวัณโรค ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ atypical cell death โดยเป็นการตายของเซลล์ที่เชื้อภายในเซลล์ยังคงมีชีวิตและสามารถออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจแล้วเกิดการแพร่กระจายได้ (219) แต่ในการศึกษาคั้งนี้พบกระบวนการทำงานของเอนไซม์ lipase activity ลดลง เนื่องด้วยเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่พบภายในเซลล์แมคโครฟาจมีกระบวนการยับยั้งการทำงานของกระบวนการอะพอพโทซิส จึงกล่าวได้ว่ากระบวนการแพร่กระจายหรือการติดเชื้อภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองนั้นอาจมีความแตกต่างกันบางประการ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ positive regulation of establishment of protein localization to telomere ได้แก่ โปรตีน CCT3 CCT4 และ CCT4 โดยโปรตีนดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของกลุ่มโปรตีน chaperonin-containing T-complex (TRiC) โดยมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการขนส่งเอนไซม์ telomerase แม้ว่ากลไกดังกล่าวยังไม่ชัดเจนในบทบาทของการติดเชื้อแบคทีเรีย แต่มีการศึกษาพบว่าในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันการดำเนินงานของ ROS ทำให้เชื้อไวรัสสามารถอาศัยอยู่ในเซลล์แมคโครฟาจได้นานยิ่งขึ้น (220) อย่างไรก็ตามในการศึกษาคั้งนี้ยังพบความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ positive regulation of DNA repair จึงเป็นไปได้ว่ากลไกดังกล่าวอาจเป็นอีกกลไกหนึ่งที่เชื้ออาจใช้ปรับเปลี่ยนกระบวนการของเซลล์แมคโครฟาจที่เกี่ยวข้องกับ telomere และการซ่อมแซม DNA เพื่อป้องกันการทำลายจาก ROS และยืดระยะเวลาการตายของเซลล์แมคโครฟาจออกไป ในช่วงสุดท้ายของการทดสอบชั่วโมงที่ 12 <-> 24 จากปฏิสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein targeting to endoplasmic reticulum (ER) และ Protein folding in endoplasmic reticulum ประกอบกับกระบวนการ IRE-1-mediated unfolded protein response ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองต่อภาวะ ER stress นั้น พบข้อสังเกตว่าจำนวนโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในส่วนของโปรตีนมนุษย์และของเชื้อมีผลรวมสูงที่สุดในช่วงเวลานี้ จึงบ่งชี้ได้ว่าเซลล์อาจอยู่ในภาวะ ER stress โดยการ

ติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าสามารถกระตุ้น ER stress ได้ เช่น *Shigella dysenteriae*, *L. monocytogenes* และ *M. tuberculosis* (221) ผ่านกลไกของปัจจัยก่อโรคที่กระตุ้นให้เกิด unfolded protein response (222) โดย ER stress สามารถเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสผ่านกลไกของ IRE1 และ calcium ion ตามมา (223) จากการศึกษาในเชื้อวัณโรคพบว่ากระบวนการข้างต้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ การค้นพบดังกล่าวนี้จึงอาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาวัณโรคที่มีการดื้อยาได้ (222) จะเห็นได้ว่าการศึกษานี้นอกจากพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการข้างต้นแล้ว ยังพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cellular response to calcium ion, IRE-1 mediated unfolded protein response และ positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนสมมติฐานข้างต้นของกระบวนการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว THP-1 ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจสามารถเกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสเชื้อ *N. gonorrhoeae* เข้าไปภายในเซลล์ภายหลังการฟาโกไซโทซิสพบว่าเชื้อสามารถอาศัยอยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจและอาจเพิ่มจำนวนได้ตามการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เดียวกันจากการทำการแยก EVs ด้วยเทคนิค ultracentrifuge พบการหลั่ง EVs จากเซลล์แมคโครฟาจ ด้วยผลการพบโปรตีน EVs markers จำนวน 27 ชนิด ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Vesiclepedia เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ของโปรตีนทั้ง 4 ช่วงเวลา พบว่าการแสดงออกของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาของการบ่มเซลล์แมคโครฟาจกับเชื้อ โดยพบว่าโปรตีนของมนุษย์มีการแสดงออกสูงในช่วงแรกของการติดเชื้อ ในช่วงเวลาที่ 0 <-> 1 และ 1 <-> 6 โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 และมีการแสดงออกต่ำในช่วงหลัง ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 และ 12 <-> 24 ในขณะที่โปรตีนของเชื้อมีการแสดงออกต่ำในช่วงแรกของการติดเชื้อและมีการแสดงออกสูงในช่วงหลัง โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 สามารถวิเคราะห์หาโปรตีนตัวแทนบ่งชี้ชีวภาพของโปรตีนของมนุษย์และเชื้อได้จากทั้งส่วนโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกันและจำเพาะกับช่วงเวลา ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อและติดตามระยะการติดเชื้อได้ อีกทั้งการวิเคราะห์ด้านคุณสมบัติ หน้าที่ของโปรตีนและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ ทำให้ทราบถึงบทบาทและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยพบว่าช่วงเวลา 0 <-> 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะ ได้แก่ โปรตีน RPS15, RPS18 และ RPS4X มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein processing ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อขนส่งออกไปยังภายนอกเซลล์ โปรตีน ARSB, CHI3L1, LUM, ATIC, HSPD1, ACTN4 และ FBLN1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell migration and motility ในการเคลื่อนที่และการรวมกลุ่มของเซลล์ โปรตีน C1QTNF3, HSPD1, LCP1, PGK1, TXNDC12, ATIC และ HSPD1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ immune response ในการหลั่ง IL-6 และการตอบสนองต่อ IL-7 และโปรตีน C1QTNF3, MDH1, MDH2, PGK1 และ TPI1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ

กระบวนการ energy production ในการลดการทำงานของกระบวนการ gluconeogenesis ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะ ได้แก่ โปรตีน RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL31, RPL4, RPLP0, RPS11, RPS23, RPS3, RPS3A, EIF3F, EIF4A1, CCT3, CCT4, CCT7, RPL11, SDCBP, ATP5F1B, IMPDH2, และ PARP1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein processing ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อส่งไปยังภายนอกเซลล์และการใช้ภายในเซลล์ โปรตีน ACTR2, ARF1, ARPC2, ARPC3, ATP5F1B และ SDCBP มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell migration and motility ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยกระบวนการ actin nucleation ผ่านการทำงานของโปรตีน arp2/3 โปรตีน ARF1, PPIA และ RPLP0 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ immune response ในการตอบสนองต่อ IL-12 โปรตีน ATP5F1B, IMPDH2 และ PARP1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ energy production ในการสังเคราะห์ NTP สำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ โปรตีน ACTR2, PARP1, RPS3, ACTR2, ARF1, ARPC2 และ ARPC3 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA repair ในการซ่อมแซมส่วนของดีเอ็นเอ และโปรตีน ANXA1, APOA1, APOC3 และ VDAC2 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ membrane stability ในการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างการตอบสนองต่อการติดเชื้อ ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะ ได้แก่ โปรตีน RPL29, RPL36 และ RSL1D1 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein processing ในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์และโปรตีน KRT2 มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell migration and motility ในการเคลื่อนที่ของเซลล์และช่วงเวลาที่ 12 <-> 24 โปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะ ได้แก่ โปรตีน HSPA5, RPLP2, HSP90B1, HSPA5, PDIA6, TLN1, CPNE1, CPNE2, NCSTN และ P4HB มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein processing ในการขนส่งโปรตีนไปยังเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและการเกิดกระบวนการ ER stress และโปรตีน PPP2R1A, PTPRC, HSPA5, YWHAQ และ YWHAQ มีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell death ในการทำงานของกระบวนการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการอะพอโทซิส ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปถึงกลไกและผลของการขนส่งโปรตีนเหล่านี้ภายใน EVs ต่อพยาธิสภาพและการตอบสนองของเซลล์ต่อการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae*

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจและโปรตีนที่ถูกบรรจุภายในถุง EVs ควรทำการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนที่มีการแสดงออกภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจเพิ่มเติม
2. เพื่อเป็นการยืนยันว่าถุง EVs ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* มีบทบาทต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว CD4+ และ CD8+ T-cell รวมถึงการหลั่ง cytokine และ chemokine ควรทำการศึกษาในส่วนนี้เพิ่มเติม

3. เพื่อให้ทราบถึงปริมาณและอัตราการหลั่ง EVs ควรทำการวัดปริมาณของจำนวนถุง EVs ที่หลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจเพิ่มเติม ด้วยเทคนิค อาทิเช่น Nano tracking particle หรือ Flow cytometry

4. เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของโปรตีนภายในถุง EVs ควรทำการคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมและทำการทดสอบยืนยันการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot



บรรณานุกรม

1. Newman L, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. **PLoS One**.(2015);10(12):e0143304.
2. Quillin SJ and Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**.(2018);16:226-40.
3. Handsfield HH, Lipman TO, Harnisch JP, Tronca E and Holmes KK. Asymptomatic gonorrhea in men. Diagnosis, natural course, prevalence and significance. **N Engl J Med**.(1974);290:117-23.
4. Bennett JE, Dolin R and Blaser MJ. **Principles and Practice of Infectious Diseases**: Elsevier Health Sciences; 2014.
5. Tapchaisri P and Sirisinha S. Serum and secretory antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* in patients with gonococcal infections. **Br J Vener Dis**.(1976);52(6):374-80.
6. Plummer FA, et al. Epidemiologic evidence for the development of serovar-specific immunity after gonococcal infection. **J Clin Investig**.(1989);83:1472-6.
7. Fox KK, Thomas JC, Weiner DH, Davis RH, Sparling PF and Cohen MS. Longitudinal Evaluation of Serovar-specific Immunity to *Neisseria gonorrhoeae*. **Am J Epidemiol**.(1999);149(4):353-8.
8. Hedges SR, Mayo MS, Mestecky J, Hook EW and Russell MW. Limited Local and Systemic Antibody Responses to *Neisseria gonorrhoeae* during Uncomplicated Genital Infections. **Infect Immun**.(1999);67(8):3937-46.
9. Boslego JW, et al. Efficacy trial of a parenteral gonococcal pilus vaccine in men. **Vaccine**.(1991);9(3):154-62.
10. Ram S, et al. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Exp Med**.(2001);193(3):281-95.
11. Criss AK and Seifert HS. A bacterial siren song: intimate interactions between *Neisseria* and neutrophils. **Nat Rev Microbiol**.(2012);10:178-90.
12. Carroll KC, et al. **Medical Microbiology Twenty-Seventh Edition**. Hobden KCCaJA, editor: McGraw-Hill Education; 2016.
13. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. **Cellular and Molecular Immunology**. China: ELSEVIER; 2018.
14. Escobar A, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Induces a Tolerogenic Phenotype in Macrophages to Modulate Host Immunity. **Mediators Inflamm**.(2013);2013:127017.

15. Mosleh IM, Huber LA, Steinlein P, Pasquali C, Günther D and Meyer TF. *Neisseria gonorrhoeae* Porin Modulates Phagosome Maturation. **J Biol Chem.**(1998);273(52):35332-8.
16. Zughaier SM, Kandler JL and Shafer WM. *Neisseria gonorrhoeae* Modulates Iron-Limiting Innate Immune Defenses in Macrophages. **PLoS One.**(2014);9(1):e87688.
17. Lorenzen DR, Günther D, Pandi J, Rudel T, Brandt E and Meyer TF. *Neisseria gonorrhoeae* Porin Modifies the Oxidative Burst of Human Professional Phagocytes. **Infect Immun.**(2000);68:6215-22.
18. Zughaier SM, Kandler JL, Balthazar JT and Shafer WM. Phosphoethanolamine Modification of *Neisseria gonorrhoeae* Lipid A Reduces Autophagy Flux in Macrophages. **PLoS One.**(2015);10(12):e0144347.
19. Tulkens PM. Intracellular distribution and activity of antibiotics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**(1991);10:100-6.
20. Unemo M and Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. **Clin Microbiol Rev.**(2014);27(3):587-613.
21. World Health Organization. **Baseline report on global sexually transmitted infection surveillance** 2012. 2013.
22. Eyre DW, et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. **Euro Surveill.**(2018);23(27):1800323.
23. Rodrigues M, Fan J, Lyon C, Wan M and Hu Y. Role of Extracellular Vesicles in Viral and Bacterial Infections: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics. **Theranostics.**(2018);8(10):2709-21.
24. Schwab A, et al. Extracellular vesicles from infected cells : potential for direct pathogenesis. **Front Microbiol.**(2015);6:1132.
25. Nudel K, Massari P and Genco CA. *Neisseria gonorrhoeae* Modulates Cell Death in Human Endocervical Epithelial Cells through Export of Exosome-Associated cIAP2. **Infect Immun** (2015);83(9):3410-7.
26. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ and Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood.**(2007);110(9):3234-44.
27. Abrami L, et al. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. **Cell Rep.**(2013);5(4):986-96.
28. Husmann M, et al. Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. **FEBS Lett.**(2008):337-44.
29. Giri PK, Kruh NA, Dobos KM and Schorey JS. Proteomic analysis identifies highly

antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. **Proteomics**.(2010);10(17):3190-202.

30. Kruh-Garcia NA, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS. **PLoS One**.(2014);9(7):e103811.

31. ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.

32. Ahmad N, Drew WL, Lagunoff M, Pottinger P, Reller LB and Sterling CR. **Sherris Medical Microbiology**: McGraw-Hill Education; 2014.

33. World Health Organization. **Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections**. 2001.

34. World Health Organization. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008**. 2012.

35. Centers for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014**. 2015.

36. Gonorrhea by County [Internet]. 2017 [cited 5 January 2019]. Available from: <https://www.cdc.gov/std/stats17/gonorrhea.htm>.

37. จรัสดาว บุญธิ. **Annual Epidemiological Surveillance Report 2012**. 2012.

38. Bureau of Epidemiology. **Number of cases, deaths, morbidity rate, mortality rate, casefatality rate**. Thailand; 2556-2560.

39. สำนักระบาดวิทยา. **สรุปรายงาน การเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2560**. กรมควบคุมโรค; 2560.

40. Harvey HA, Ketterer MR, Preston A, Lubaroff D, Williams R and Apicella MA. Ultrastructure analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. **Infect Immun**.(1997);65:2420-7.

41. Harvey HA, Jennings MP, Campbell CA, Williams R and Apicella MA. Receptormediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. **Mol Microbiol**.(2001);42:659-72.

42. Schneider H, Griffiss JM, Boslego JW, Hitchcock PJ, Zahos KM and Apicella MA. Expression of paragloboside-like lipooligosaccharides may be a necessary component of gonococcal pathogenesis in men. **J Exp Med**.(1991);174:1601-5.

43. Parsons NJ, Curry A, Fox AJ, Jones DM, Cole JA and Smith H. The serum resistance of gonococci in the majority of urethral exudates is due to sialylated lipopolysaccharide seen as a surface coat. **FEBS Lett**.(1992);69:295-9.

44. Ramsey KH, et al. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhea. **J Infect Dis**.(1995);172:186-91.

45. Schneider H, et al. Experimental human gonococcal urethritis: 250 *Neisseria gonorrhoeae* MS11mkC are infective. **J Infect Dis.**(1995);172:180-5.
46. Harvey HA, Post DMB and Apicella MA. immortalization of human urethral epithelial cells: a model for the study of the pathogenesis of and the inflammatory cytokine response to *Neisseria gonorrhoeae* infection. **Infect Immun.**(2002);70:5808-15.
47. Ober WB. Boswell's clap. **JAMA.**(1970);212:91-5.
48. Rest RF, Liu J, Talukdar R, Frangipane JV and Simon D. Interaction of pathogenic *Neisseria* with host defenses. What happens in vivo? **Ann N Y Acad Sci.**(1994);730:182-96.
49. Shafer WM and Rest RF. Interactions of gonococci with phagocytic cells. **Annu Rev Microbiol.**(1989);43:121-45.
50. Stocks SC, Kerr MA, Haslett C and Dransfield I. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biol.**(1995);58:40-8.
51. Densen P. Interaction of complement with *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Clin Microbiol Rev.**(1989);2:11-7.
52. Edwards JL and Apicella MA. The role of lipooligosaccharide in *Neisseria gonorrhoeae* pathogenesis of cervical epithelia: lipid A serves as a C3 acceptor molecule. **Cell Microbiol.**(2002);4:585-98.
53. Edwards JL, Brown EJ, Ault KA and Apicella MA. The role of complement receptor 3 (CR3) in *Neisseria gonorrhoeae* infection of human cervical epithelia. **Cell Microbiol.**(2001);3:611-22.
54. Mandrell RE. Further antigenic similarities of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides and human glycosphingolipids. **Infect Immun.**(1992);60:3017-20.
55. Edwards JL, Brown EJ, S. Uk-Nham, Cannon JG, Blake MS and Apicella MA. A cooperative interaction between *Neisseria gonorrhoeae* and complement receptor 3 mediates infection of primary cervical epithelial cells. **Cell Microbiol.**(2002);4:571-84.
56. Edwards JL, Shao JQ, Ault KA and Apicella MA. *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. **Infect Immun.**(2000);68:5354-63.
57. Edwards JL, Entz DD and Apicella MA. Gonococcal phospholipase D modulates the expression and function of complement receptor 3 in primary cervical epithelial cells. **Infect Immun.**(2003);71:6381-91.
58. Tauber PF, Wettich W, Nohlen M and Zaneveld LJ. Diffusible proteins of the mucosa of the human cervix, uterus, and fallopian tubes: distribution and variations during the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol.**(1985);151:1115-25.

59. Hasty LA, Lambris JD, Lessey BA, Pruksananonda K and Lyttle CR. Hormonal regulation of the complement components and receptors throughout the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol.**(1994);170:168-75.
60. Morse SA and Brooks GF. **Gonococcal infection.** London, United Kingdom: Butler and Tanner; 1975.
61. Anderson JE, Leone PA, Miller WC, Chen C, Hobbs MM and Sparling PF. Selection for expression of the gonococcal hemoglobin receptor during menses. **J Infect Dis.**(2001);184:1621-3.
62. Bolan G, Ehrhardt AA and Wasserheit JN. **Sexually transmitted diseases, 3rd ed.** New York, N.Y.: McGraw-Hill; 1999.
63. Chen JC, Bavoil P and Clark VL. Enhancement of the invasive ability of *Neisseria gonorrhoeae* by contact with HeclB, an adenocarcinoma endometrial cell line. **Mol Microbiol.**(1991);5:1531-8.
64. Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N and Luborsky JL. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. **J Clin Endocrinol Metab.**(1990);70:421-30.
65. Gorby GL, Clemens CM, Barley LR and McGee ZA. Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on *Neisseria gonorrhoeae* invasion of and IgA secretion by human fallopian tube mucosa. **Microb Pathog.**(1991);10(5):373-84.
66. Melly MA, McGee ZA and Rosenthal RS. Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian- tube mucosa. **J Infect Dis.**(1984);149:378-86.
67. Cooper MD, McGraw PA and Melly MA. Localization of gonococcal lipopolysaccharide and its relationship to toxic damage in human fallopian tube mucosa. **Infect Immun.**(1986);51:425-30.
68. McGee ZA, Clemens CM, Jensen RL, Klein JJ, Barley LR and Gorby GL. Local induction of tumor necrosis factor as a molecular mechanism of mucosal damage by gonococci. **Microb Pathog.**(1992);12:333-41.
69. Ng L-K and Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. **Can J Infect Dis Med Microbiol.**(2005);16(1):15-25.
70. Bignell C, Unemo M and European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **Int J STD AIDS.**(2013);24(2):85-92.
71. World Health Organization. **Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus.** Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2013.

72. Katz AR, Effler PV, Ohye RG, Brouillet B, Lee MVC and Whitaric PM. False-positive gonorrhoea test results with a nucleic acid amplification test: the impact of low prevalence on positive predictive value. **Clin Infect Dis.**(2004);36(6):814-9.
73. Palmer HM, Mallinson H, Wood RL and Herring AJ. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol.**(2003);41(2):835-7.
74. Herring A, Ballard R, Mabey D and Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: chlamydia and gonorrhoea. **Nat Rev Microbiol.**(2006);4:S41-S8.
75. Centers for Disease and Prevention. **Update to CDC's Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010 : Oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections.** 2012.
76. Renard C, Vanderhaeghe HJ, Claes PJ, Zenebergh A and Tulkens PM. Influence of conversion of penicillin G into a basic derivative on its accumulation and subcellular localization in cultured macrophages. **Antimicrob Agents Chemother.**(1987);31:410-6.
77. Carryn S, Chanteux H, C.Seral, M.-P. Mingeot-Leclercq, F. Van Bambeke and Tulkens PM. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. **Infect Dis Clin North Am.**(2003);17:615-34.
78. Seral C, Carryn S, Tulkens PM and F. Van Bambeke. Influence of Pglycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother.**(2003);51:1167-73.
79. Nagai J and Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. **Drug Metab Pharmacokinet.**(2004);19:159-70.
80. Lahra MM and WHO Western Pacific and South East Asian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. **Surveillance of antibiotic resistance in 'Neisseria gonorrhoeae' in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions,** 2010. 2012.
81. World Health Organization. **Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary.** 2014.
82. Cannon JG, Buchanan TM and Sparling PF. Confirmation of association of protein I serotype of *Neisseria gonorrhoeae* with ability to cause disseminated infection. **Infect Immun.**(1983);40:816-9.
83. Joiner KA, Warren KA, Brown EJ, Swanson J and Frank MM. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. IV. C5b-9 forms high molecular weight complexes with bacterial outer membrane constituents on

- serum-resistant but not on serum-sensitive *Neisseria gonorrhoeae*. **J Immunol.**(1983);131:1443-51.
84. Joiner KA, Warren KA, Hammer C and Frank MM. Bactericidal but not nonbactericidal C5b-9 is associated with distinctive outer membrane proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. **J Immunol.**(1985);134:1920-5.
85. Geddes K, Magalhães JG and Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. **Nat Rev Drug Discov.**(2009);8:465-79.
86. Kumar H, Kawai T and Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun.**(2009);388:621-5.
87. Kaparakis M, et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. **Cell Microbiol.**(2010);12:372-85.
88. Château A and Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* survives within and modulates apoptosis and inflammatory cytokine production of human macrophages. **Cell Microbiol.**(2016);18:546-60.
89. Ortiz MC, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Modulates Immunity by Polarizing Human Macrophages to a M2 Profile. **PLoS One.**(2015);10(6):e0130713.
90. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D and Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. **Curr Opin Microbiol.**(2013);16:23-31.
91. Knepper B, Heuer I, Meyer TF and J. P. van Putten. Differential Response of Human Monocytes to *Neisseria gonorrhoeae* Variants Expressing Pili and Opacity Proteins. **Infect Immun.**(1997);65(10):4122-9.
92. Escobar A, Rodas PI and Acuña-Castillo C. Macrophage-*Neisseria gonorrhoeae* Interactions: A Better Understanding of Pathogen Mechanisms of Immunomodulation. **Front Immunol.**(2018);9:3044.
93. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C and Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. **Blood.**(2005);105(3):1162-9.
94. Mège J-L, Mehraj V and Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis.**(2011);24(3):230-4.
95. Benoit M, Barbarat B, Bernard A, Olive D and Mege J-L. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. **Eur J Immunol.**(2008);38(4):1065-70.
96. Tumitan ARP, Monnazzi LGS, Ghiraldi FR, Cilli EM and B. M. M. de Medeiros. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice. **Microbiol Immunol.**(2007);51(10):1021-8.
97. Kiszewski AE, et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli

disease. **Clin Exp Immunol.**(2006);143(3):445-51.

98. Biswas SK and Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol.**(2010);11(10):889-96.

99. Guleria I, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. **J Exp Med.**(2005);202(2):231-7.

100. Mozaffarian N, Wiedeman AE and Stevens AM. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. **Rheumatology.**(2008);47(9):1335-41.

101. Drakesmith H and Prentice AM. Hepcidin and the iron-infection axis. **Science.**(2012);338:768-72.

102. Flo TH, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature.**(2004);432:917-21.

103. Ganz T and Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. **Annu Rev Med.**(2011);62:347-60.

104. Wang J and Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochem J.**(2011);434:365-81.

105. Cabantchik ZI, Kakhlon O, Epsztejn S, Zanninelli G and Breuer W. Intracellular and extracellular labile iron pools. **Adv Exp Med Biol.**(2002);509:55-75.

106. Devireddy LR, Hart DO, Goetz D and Green MR. A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. **Cell** (2010);141:1006-17.

107. Bjerknes R, Guttormsen HK, Solberg CO and Wetzler LM. Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerisation, degranulation, opsonin receptor expression, and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. **Infect Immun.**(1995);63:160-7.

108. Haas A and Goebel W. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. **Free Radical Res Commun.**(1992);16:137-57.

109. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.**(2007);35(4):495-516.

110. Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K and Sasaki M. Autophagy-physiology and pathophysiology. **Histochem Cell Biol.**(2008);129:407-20.

111. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, S. Oshitani-Okamoto, Ohsumi Y and Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. **J Cell Sci.**(2004);117:2805-12.

112. Delabranche X, Berger A, J. Boisramé-Helms and Meziani F. Microparticles and infectious diseases. **Med Mal Infect.**(2012);42:335-43.

113. Fleming A, et al. The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. **Pathog Dis.**(2014);71:109-20.
114. Kalasin S and Santore MM. Engineering nanoscale surface features to sustain microparticle rolling in flow. **ACS Nano.**(2015);9(5):4706-16.
115. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L and Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J Biol Chem.**(1987);262:9412-20.
116. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol.**(1967);13:269-88.
117. Horstman LL and Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. **Crit Rev Oncol Hematol.**(1999);30:111-42.
118. Mause SF and Weber C. Microparticles : Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. **Circ Res.**(2010);107:1047-57.
119. Henseleit U, Plasa G and Haest C. Effects of divalent cations on lipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. **Biochim Biophys Acta.**(1990);2:127-35.
120. Fox JE, Austin CD, Reynolds CC and Steffen PK. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. **J Biol Chem.**(1991);266:13289-95.
121. Meziani F, Delabranche X, Asfar P and Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles-a new player in sepsis? **Crit Care.**(2010);14:236.
122. Nieuwland R, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood.**(2000);95:930-5.
123. Bronson DL, Fraley EE, Fogh J and Kalter SS. Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera-1) cell cultures: an electron microscopic study. **J Natl Cancer Inst.**(1979);63(2):337-9.
124. Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK and Lenz J. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. **Curr Biol.**(1999);9(16):861-8.
125. Florl AR, Löwer R, B. J. Schmitz-Dräger and Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. **Br J Cancer.**(1999);80(9):1312-21.
126. Depil S, Roche C, Dussart P and Prin L. Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. **Leukemia.**(2002);16(2):254-9.
127. Bieda K, Hoffmann A and Boller K. Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. **J Gen Virol.**(2001);82:591-6.

128. Pincetic A and Leis J. The Mechanism of Budding of Retroviruses From Cell Membranes. **Adv Virol.**(2009);2009:623969.
129. Gladnikoff M, Shimoni E, Gov NS and Rousso I. Retroviral Assembly and Budding Occur through an Actin-Driven Mechanism. **Biophys J.**(2009);97(9):2419-28.
130. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.**(1972);26(4):239-57.
131. Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, Okumura H and Ueno Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. **Virchows Arch.**(1998);433(5):443-7.
132. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS and Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **J Neurooncol.**(2013);113(1):1-11.
133. Bergsmedh A, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. **Proc Natl Acad Sci USA.**(2001);98(11):6407-11.
134. Théry C, Zitvogel L and Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol.**(2002);2:569-79.
135. Tamai K, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-protein. **Biochem Bioph Res Co.**(2010);399:384-90.
136. Boucheix C and Rubinstein E. Tetraspanins. **Cell Mol Life Sci.**(2001);58:1189-205.
137. Hemler ME. Targeting of tetraspanin proteins-potential benefits and strategies. **Nat Rev Drug Discov.**(2008);7:747-58.
138. Mittelbrunn M, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nat Commun.**(2011);2:282.
139. Schorey JS and Harding CV. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. **J Clin Invest.**(2016);126:1181-9.
140. Ni Z, et al. Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. **Bone Res.**(2020);8:25.
141. Singh PP, Smith VL, Karakousis PC and Schorey JS. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo. **J Immunol.**(2012);189(2):777-85.
142. Bhatnagar S and Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. **J Biol Chem.**(2007);282(35):25779-89.
143. Yang C, Ruffner MA, Kim S-H and Robbins PD. Plasma-derived MHC class II+ exosomes from tumor-bearing mice suppress tumor antigen-specific immune responses. **Eur J Immunol.**(2012);42:1778-84.

144. Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market. **Nat Biotechnol.**(2016);34:359-60.
145. Kulp A and Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu Rev Microbiol.**(2010);64:163-84.
146. Pérez-Cruz C, Delgado L, C. López-Iglesias and Mercade E. Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. **PLoS One.**(2015):e0116896.
147. Lee E-Y, Choi D-S, Kim K-P and Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. **Mass Spectrom Rev.**(2008);27:535-55.
148. Lee JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. **FEMS Microbiol Lett.**(2012);331(1):17-24.
149. Sharpe SW, Kuehn MJ and Mason KM. Elicitation of Epithelial Cell-Derived Immune Effectors by Outer Membrane Vesicles of Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infect Immun.**(2011);79(11):4361-9.
150. Hong W, Mason K, Jurcisek J, Novotny L, Bakaletz LO and Swords WE. Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. **Infect Immun.**(2007);75:958-65.
151. Lappann M, Otto A, Becher D and Vogel U. Comparative Proteome Analysis of Spontaneous Outer Membrane Vesicles and Purified Outer Membranes of *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol.**(2013);195(19):4425-35.
152. Deo P, et al. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. **PLoS Pathog.**(2018);14(3):e1006945.
153. Shah TR and Misra A. **Proteomics**. Misra A, editor: Elsevier Inc.; 2011.
154. Graves PR and Haystead TAJ. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev.**(2002);66:39-63.
155. Ginsburg GS and Willard HF. **Essentials of Genomic and Personalized Medicine**: Elsevier Inc; 2010.
156. Matthiesen R. **Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics**. Walker JM, editor. Totowa, New jersey: HUMANA PRESS; 2007.
157. Baldwin MA. Protein Identification by Mass Spectrometry. **J Biol Chem.**(2004):S24.
158. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucl Acids Res.**(2019);47(D1):D506-D15.
159. Kalra H, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. **PLoS Biology.**(2012);10(12):e1001450.

160. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X and Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. **Nucl Acids Res.**(2019);47(D1):D419-D26.
161. Wu S, Zhu Z, Fu L, Niu B and Li W. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. **BMC Genomics volume.**(2011);12:444.
162. Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. **Nat Protoc.**(2009);4(1):44-57.
163. Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA. Bioinformatics Enrichment Tools: Paths Toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists. **Nucleic Acids Res.**(2009);37(1):1-13.
164. Szklarczyk D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Res.**(2019);47(D1):D607-D13.
165. Shannon P, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Res.**(2003);13(11):2498-504.
166. Bindea G, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics.**(2009);25(8):1091-3.
167. Wen C, Seeger RC, Fabbri M, Wang L, Wayne AS and Jong AY. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles.**(2017);6(1):1400370.
168. Simpson RJ, Jensen SS and Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics.**(2008);8(19):4083-99.
169. Kharaziha P, et al. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. **Oncotarget.**(2015);6(25):21740-54.
170. Lazar I, et al. Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. **Pigment Cell Melanoma Res.**(2015);28(4):464-75.
171. Zhou H, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. **Kidney International.**(2006);70(10):1847-57.
172. B. W. M. van Balkom, Pisitkun T, Verhaar MC and Knepper MA. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. **Kidney Int.**(2011);80(11):1138-45.
173. Leuzzi R, et al. Ng-MIP, a surface-exposed lipoprotein of *Neisseria gonorrhoeae*, has a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) activity and is involved in persistence in macrophages. **Mol Microbiol.**(2005);58(3):669-81.

174. Gardiner C, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. **J Extracell Vesicles.**(2016);5:32945.
175. Momen-Heravi F, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. **Biol Chem.**(2013);394(10):1253-62.
176. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV and Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. **Biomed Res Int.**(2018);2018:1-27.
177. Lehrich BM, Liang Y, Khosravi P, Federoff HJ and Fiandaca MS. Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media. **Int J Mol Sci.**(2018);19:3538.
178. Eitan E, Zhang S, Witwer KW and Mattson MP. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. **J Extracell Vesicles.**(2015);4:26373.
179. Witwer KW, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **J Extracell Vesicles.**(2013);2:20360.
180. Diaz G, Wolfe LM, N. A. Kruh-Garcia and Dobos KM. Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Sci Rep.**(2016);6:37975.
181. Zhou C-X, et al. Analysis of the serum peptidome associated with *Toxoplasma gondii* infection. **J Proteomics.**(2020);222:103805.
182. Sun H, et al. Label-Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Plasma Biomarkers for Distinguishing Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. **Front Microbiol.**(2018);9:1267.
183. Schorey JS and Bhatnagar S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. **Traffic.**(2008);9:871-81.
184. Poirier V, G. Av-Gay and Y. Av-Gay. Global Proteomic Analyses of Macrophage Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **BioRxiv** (2017):110304.
185. Li H, et al. Quantitative proteomic analysis of host responses triggered by *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophage cells. **Acta Biochim Biophys Sin.**(2017);49(9):835-44.
186. Li P, et al. Comparative Proteomics Analysis of Human Macrophages Infected with Virulent *Mycobacterium bovis*. **Front Cell Infect Microbiol.**(2017);7:65.
187. Anand PK. Exosomal Membrane Molecules Are Potent Immune Response Modulators. **Commun Integr Biol.**(2010);3(5):405-8.
188. Théry C, Zitvogel L and Amigorena S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. **Nat Rev Immunol.**(2002);2(8):569-79.

189. Wang G, et al. Proteomic Profiling of LPS-Induced Macrophage-Derived Exosomes Indicates Their Involvement in Acute Liver Injury. **Proteomics**.(2019);19:1800274.
190. Statello L, et al. Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. **PLoS One**.(2018);13(4):e0195969.
191. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC and Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. **Nat Rev Mol Cell Biol**.(2020);21(10):585-606.
192. Ung TH, Madsen HJ, Hellwinkel JE, Lencioni AM and Graner MW. Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways. **Cancer Sci** (2014);105:1384-92.
193. Oehmcke S, et al. A Novel Role for Pro-Coagulant Microvesicles in the Early Host Defense against *Streptococcus pyogenes*. **PLoS Pathog**.(2013);9(8):e1003529.
194. Wonga K-W and W. R. Jacobs Jr. *Mycobacterium Tuberculosis* Exploits Human Interferon γ to Stimulate Macrophage Extracellular Trap Formation and Necrosis. **J Infect Dis**.(2013);208(1):109-19.
195. Chen R, Kang R, Fan X-G and Tang D. Release and activity of histone in diseases. **Cell Death Dis**.(2014);5(8):10.1038/cddis.2014.337.
196. Liu Q, et al. Proteomic profiling for plasma biomarkers of tuberculosis progression. **Mol Med Rep**.(2018);18(2):1551-9.
197. Feil E, Zhou J, Smith JM and Spratt BG. A Comparison of the Nucleotide Sequences of the *adk* and *recA* Genes of Pathogenic and Commensal *Neisseria* Species: Evidence for Extensive Interspecies Recombination Within *adk* **J Mol Evo**.(1996);43:631-40.
198. Lauer P, Albertson NH and Koomey M. Conservation of Genes Encoding Components of a Type IV Pilus assembly/two-step Protein Export Pathway in *Neisseria Gonorrhoeae*. **Mol Microbiol**.(1993);8(2):357-68.
199. Tønjum T, Freitag NE, Namork E and Koomey M. Identification and Characterization of pilG, a Highly Conserved Pilus-Assembly Gene in Pathogenic *Neisseria*. **Mol Microbiol**.(1995);16(3):451-64.
200. Brossay L, Paradis G, Fox R, Koomey M and Hébert J. Identification, localization, and distribution of the PilT protein in *Neisseria gonorrhoeae*. **Infect Immun**.(1994);62(6):2302-8.
201. Reuse HD and Taha MK. RegF, an SspA homologue, regulates the expression of the *Neisseria gonorrhoeae* pilE gene. **Res Microbiol**.(1997);148(4):289-303.

202. Ropp PA, Hu M, Olesky M and Nicholas RA. Mutations in *ponA*, the Gene Encoding Penicillin-Binding Protein 1, and a Novel Locus, *penC*, Are Required for High-Level Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother.**(2002);46(3):769-77.
203. Belland RJ, Morrison SG, Ison C and Huang WM. *Neisseria gonorrhoeae* Acquires Mutations in Analogous Regions of *gyrA* and *parC* in Fluoroquinolone-Resistant Isolates. **Mol Microbiol.**(1994);14(2):371-80.
204. Stohl EA and Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* DNA Recombination and Repair Enzymes Protect against Oxidative Damage Caused by Hydrogen Peroxide. **J Bacteriol.**(2006);188(21):7645-51.
205. Seib KL, Tseng H-J, McEwan AG, Apicella MA and Jennings MP. Defenses Against Oxidative Stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: Distinctive Systems for Different Lifestyles. **J Infect Dis.**(2004);190(1):136-47.
206. Shafer WM, Qu X, Waring AJ and Lehrer RI. Modulation of *Neisseria Gonorrhoeae* Susceptibility to Vertebrate Antibacterial Peptides Due to a Member of the resistance/nodulation/division Efflux Pump Family. **Proc Natl Acad Sci U S A.**(1998);95(4):1829-33.
207. Cornelissen CN and Hollander A. TonB-Dependent Transporters Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*. **Front Microbiol.**(2011);2:117.
208. Jerse AE, Bash MC and Russell MW. Vaccines against gonorrhea: Current status and future challenges. **Vaccine.**(2014);32(14):1579-87.
209. Du Y, Lenz J and Arvidson CG. Global Gene Expression and the Role of Sigma Factors in *Neisseria gonorrhoeae* in Interactions with Epithelial Cells. **Infect Immun.**(2005);73(8):4834-45.
210. Connor DO, Zantow J, Hust M, Bier FF and M. von Nickisch-Roseneck. Identification of Novel Immunogenic Proteins of *Neisseria gonorrhoeae* by Phage Display. **PLoS One.**(2016);11(2):e0148986.
211. Brilha S, Wysoczanski R, Whittington AM, Friedland JS and Porter JC. Monocyte Adhesion, Migration, and Extracellular Matrix Breakdown Are Regulated by Integrin $\alpha\beta3$ in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **J Immunol.**(2017);199(3):982-91.
212. Hedges SR, Sibley DA, Mayo MS, Hook EW and Russell MW. Cytokine and Antibody Responses in Women Infected with *Neisseria gonorrhoeae*: Effects of Concomitant Infections. **J Infect Dis.**(1998);178(3):742-51.
213. Ramsey KH, et al. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhea. **J Infect Dis.**(1995);172(1):186-91.
214. Singh PP and Goyal A. Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial

infection. **Springerplus**.(2013);2:686.

215. Maeurer MJ, et al. Interleukin-7 or Interleukin-15 Enhances Survival of *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice. **Infect Immun**.(2000);68(5):2962-70.

216. Marrero J, Rhee KY, Schnappinger D, Pethe K and Ehrt S. Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for *Mycobacterium tuberculosis* to establish and maintain infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**.(2010);107(21):9819-24.

217. Hamon M, Bierne H and Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nat Rev Microbiol**.(2006);4:423-34.

218. Yeung ATY, et al. A Genome-Wide Knockout Screen in Human Macrophages Identified Host Factors Modulating *Salmonella* Infection. **mBio**.(2019);10(5):e02169-19.

219. Lee J, Repasy T, Papavinasundaram K, Sasseti C and Kornfeld H. *Mycobacterium tuberculosis* Induces an Atypical Cell Death Mode to Escape from Infected Macrophages. **PLoS One**.(2011);6(3):e18367.

220. Reynoso R, et al. HIV-1 Induces Telomerase Activity in Monocyte-Derived Macrophages, Possibly Safeguarding One of Its Reservoirs. **J Virol**.(2012);86(19):10327-37.

221. Pillich H, Loose M, Zimmer K-P and Chakraborty T. Diverse roles of endoplasmic reticulum stress sensors in bacterial infection. **Mol Cell Pediatr**.(2016);3:9.

222. Choi J-A and Song C-H. Insights Into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Infectious Diseases. **Front Immunol**.(2020);10:3147.

223. Sano R and Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochim Biophys Acta**.(2013);1833(22):3460-70.



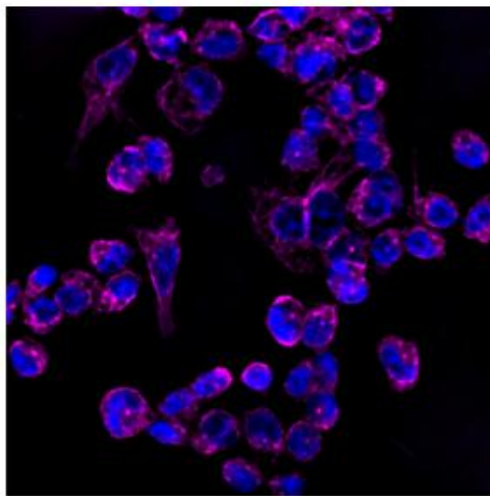
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

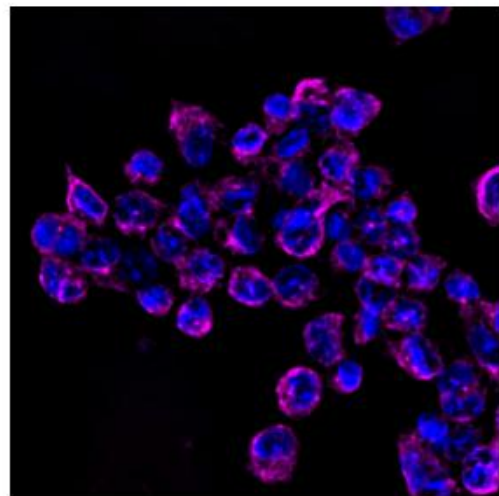
ภาคผนวก ก

1. ภาพจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Deconvolution microscope ของเซลล์แมโครฟาจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการบ่มร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เวลา 1 6 12 และ 24 ชั่วโมง

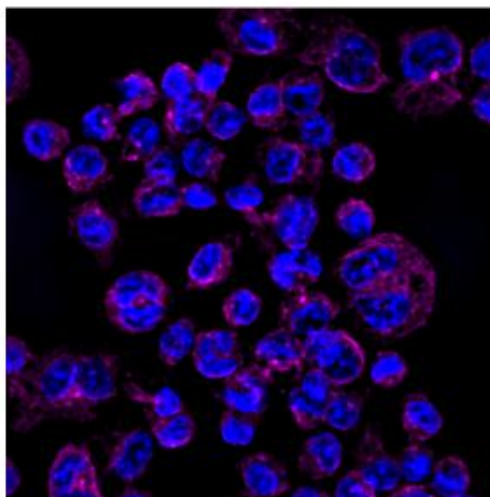
1 ชั่วโมง



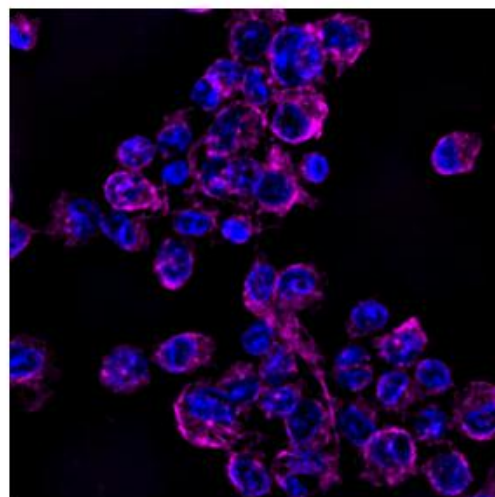
6 ชั่วโมง



12 ชั่วโมง

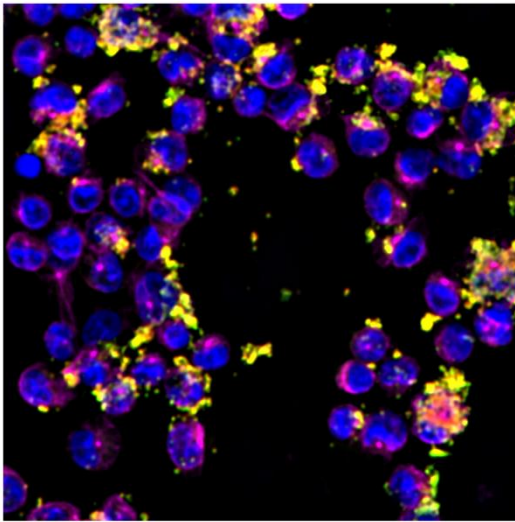


24 ชั่วโมง

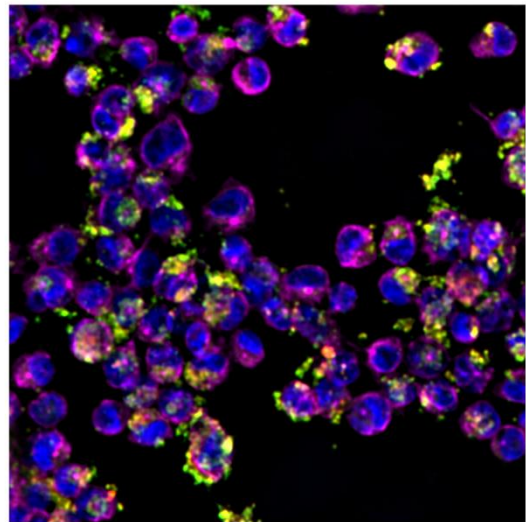


2. ภาพจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Deconvolution microscope ของเซลล์แมคโครฟาจากกลุ่มทดสอบที่ปนเปื้อนร่วมกับเชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่เวลา 1 6 12 และ 24 ชั่วโมง

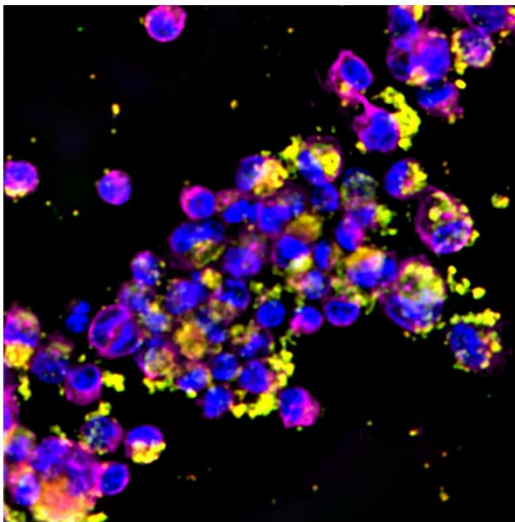
1 ชั่วโมง



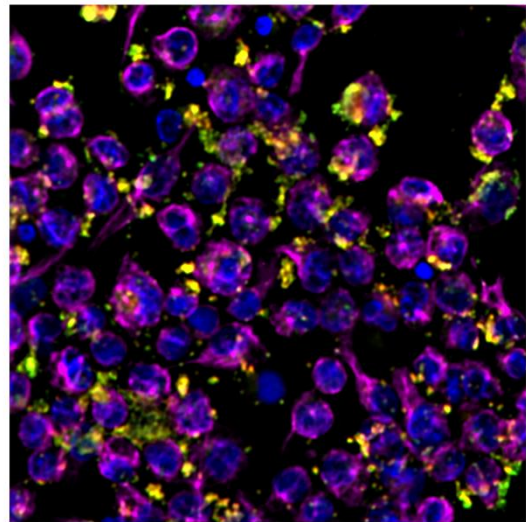
6 ชั่วโมง



12 ชั่วโมง

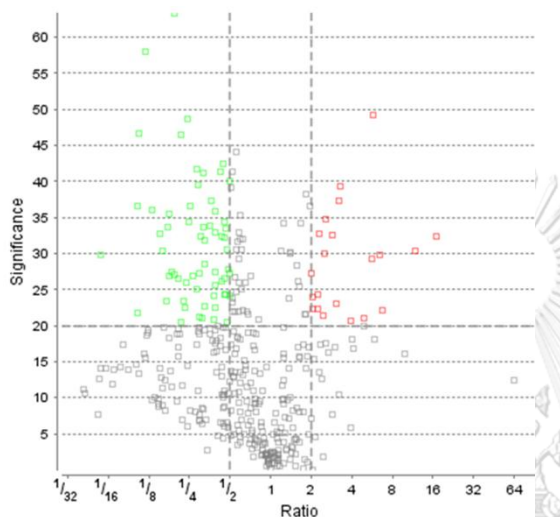


24 ชั่วโมง

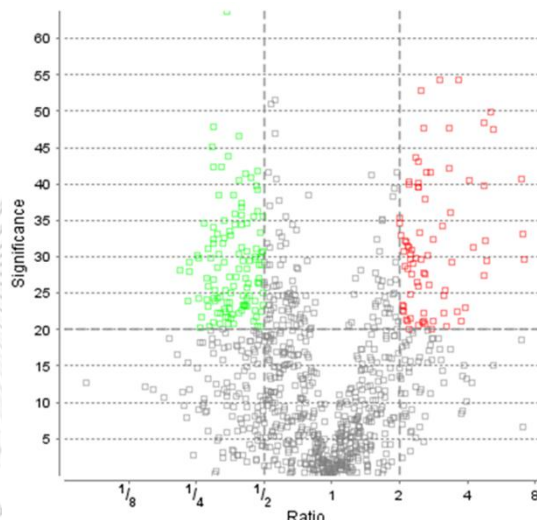


3. กราฟ volcano plot ของการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ โดยเป็นการสร้างกราฟระหว่างค่านัยสำคัญ (significance) และค่า Log₂ ratio โดยสีเขียวคือโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงและสีแดงคือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

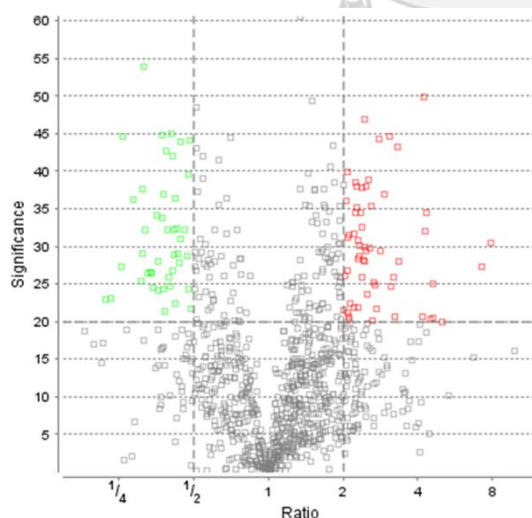
ช่วงเวลาที่ 0 <-> 1



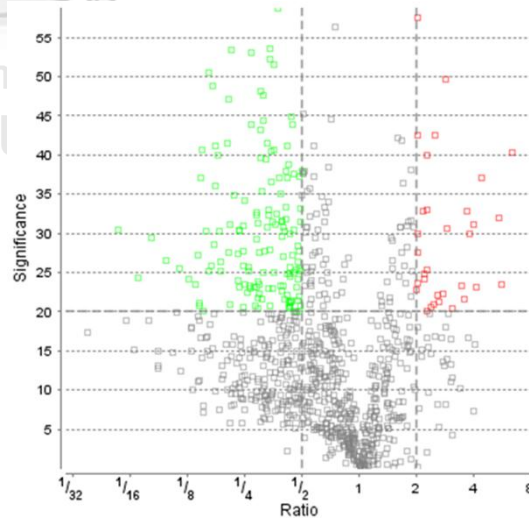
ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6



ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12



ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24



4. ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีค่าเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนในช่วงเวลาที่ 0 <-> 1

No.	Uniprot Accession	Protein Symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
1	P35232	PHB	Prohibitin	29.87	2	0.06	29804
2	P40926	MDHM	Malate dehydrogenase mitochondrial	36.65	1	0.1	35503
3	P36542	ATPG	ATP synthase subunit gamma mitochondrial	21.74	2	0.1	32996
4	B4DJV2	B4DJV2	Citrate synthase	46.55	3	0.11	50432
5	O75390	CISY	Citrate synthase mitochondrial	46.55	3	0.11	51712
6	Q86UP3	ZFHX4	Zinc finger homeobox protein 4	58.04	1	0.12	393732
7	E7EVZ1	E7EVZ1	Zinc finger homeobox protein 4	58.04	1	0.12	396217
8	P06703	S10A6	Protein S100-A6	35.94	1	0.13	10180
9	R4GN98	R4GN98	Protein S100 (Fragment)	35.94	1	0.13	9681
10	Q9Y277	VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	32.77	2	0.15	30659
11	Q99816	TS101	Tumor susceptibility gene 101 protein	30.36	1	0.16	43944
12	F5H442	F5H442	Tumor susceptibility gene 101 protein	30.36	1	0.16	40918
13	P00403	COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2	33.73	1	0.17	25565
14	Q9UQ80	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	23.44	1	0.17	43787
15	O75695	XRP2	Protein XRP2	35.53	1	0.18	39641
16	R4GMR5	R4GMR5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	27.37	1	0.18	32552
17	P48556	PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	27.37	1	0.18	39612
18	P52566	GDJR2	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	26.95	2	0.18	22988
19	P21796	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	63.38	1	0.19	30773
20	Q9BPX5	ARP5L	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	26.99	1	0.19	16941
21	P62805	H4	Histone H4	46.51	8	0.21	11367
22	Q15008	PSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	26.5	2	0.21	45531
23	P62269	RS18	40S ribosomal protein S18	20.48	3	0.21	17719

No.	Uniprot Accession	Protein Symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
24	P60174	TPIS	Triosephosphate isomerase	25.99	3	0.23	30791
25	O00754	MA2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	23.35	2	0.23	113744
26	P40939	ECHA	Trifunctional enzyme subunit alpha mitochondrial	22.45	1	0.23	83000
27	H0YFD6	H0YFD6	Trifunctional enzyme subunit alpha mitochondrial	22.45	1	0.23	86372
28	P10809	CH60	60 kDa heat shock protein mitochondrial	48.58	4	0.24	61055
29	P39019	RS19	40S ribosomal protein S19	36.49	3	0.25	16060
30	P12956	XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	34.36	2	0.25	69843
31	P38606	VATA	V-type proton ATPase catalytic subunit A	26.91	2	0.27	68304
32	P36222	CH3L1	Chitinase-3-like protein 1	41.61	4	0.29	42625
33	P24534	EF1B	Elongation factor 1-beta	39.57	1	0.29	24764
34	Q16658	FSCN1	Fascin	25.12	2	0.29	54530
35	P15848	ARSB	Arylsulfatase B	32.3	1	0.3	59687
36	B7Z6Z4	B7Z6Z4	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	26707
37	F8W1R7	F8W1R7	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	16290
38	P60660	MYL6	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	16930
39	G8JLA2	G8JLA2	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	17089
40	J3KND3	J3KND3	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	17058
41	G3V1V0	G3V1V0	Myosin light polypeptide 6	27.29	2	0.3	18037
42	P22695	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial	21.23	5	0.3	48443
43	Q92930	RAB8B	Ras-related protein Rab-8B	20.94	1	0.31	23584
44	H0YNE9	H0YNE9	Ras-related protein Rab-8B (Fragment)	20.94	1	0.31	21868
45	P42766	RL35	60S ribosomal protein L35	41.19	2	0.32	14551
46	P06748	NPM	Nucleophosmin	33.6	1	0.32	32575
47	P23142	FBLN1	Fibulin-1	28.49	3	0.32	77214
48	O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	22.75	1	0.32	104854
49	P49755	TMEDA	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	31.74	5	0.33	24976

No.	Uniprot Accession	Protein Symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
50	P13796	PLSL	Plastin-2	37.25	5	0.36	70289
51	Q71UJ9	H2AV	Histone H2A.V	33.85	1	0.36	13509
52	H0Y4R1	H0Y4R1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment)	24.05	2	0.38	51077
53	P12268	IMDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	24.05	2	0.38	55805
54	P07996	TSP1	Thrombospondin-1	22.57	4	0.38	129383
55	P61088	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	20.89	1	0.38	17138
56	P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	35.9	5	0.39	44615
57	J3KMX3	J3KMX3	Alpha-fetoprotein	32.94	2	0.39	70450
58	P02771	FETA	Alpha-fetoprotein	32.94	2	0.39	68678
59	P26447	S10A4	Protein S100-A4	27.44	2	0.39	11729
60	P05141	ADT2	ADP/ATP translocase 2	25.52	1	0.39	32852
61	Q86UX7	URP2	Fermitin family homolog 3	41.38	3	0.43	75953
62	Q04760	LGUL	Lactoylglycylglutathione lyase	32.44	1	0.43	20778
63	P50995	ANX11	Annexin A11	42.47	6	0.44	54390
64	P50991	TCPD	T-complex protein 1 subunit delta	26.15	2	0.44	57924
65	H3BUJ0	H3BUJ0	IST1 homolog (Fragment)	26.44	2	0.45	27911
66	P53990	IST1	IST1 homolog	26.44	2	0.45	39751
67	H3BMU1	H3BMU1	IST1 homolog (Fragment)	26.44	2	0.45	23375
68	Q96FN4	CPNE2	Copine-2	24.25	1	0.45	61190
69	Q9BXJ4	C1QT3	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	34.36	1	0.46	26994
70	E9PGA6	E9PGA6	C1QTNF3-AMACR readthrough (NMD candidate)	34.36	1	0.46	31075
71	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	32.21	11	0.46	56782
72	P05546	HEP2	Heparin cofactor 2	33.47	1	0.47	57071
73	K7ELC2	K7ELC2	40S ribosomal protein S15	30.52	1	0.47	17723
74	P62841	RS15	40S ribosomal protein S15	30.52	1	0.47	17040
75	P51991	ROA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	24.38	1	0.47	39595

No.	Uniprot Accession	Protein Symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
76	Q9RVK6	TMED9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	27.79	1	0.48	27277
77	P61353	RL27	60S ribosomal protein L27	20.45	1	0.48	15798
78	P40925	MDHC	Malate dehydrogenase cytoplasmic	27.2	2	0.49	36426
79	O95881	TXD12	Thioredoxin domain-containing protein 12	24.04	2	0.49	19206
80	P63104	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	39.99	3	0.5	27745
81	A0A2R8YDZ0	A0A2R8YDZ0	Basigin	30.28	1	11.69	13878
82	P02751	FINC	Fibronectin	32.37	4	16.92	272318
83	F8W914	F8W914	Reticulon	27.32	1	2.02	37145
84	P36578	RL4	60S ribosomal protein L4	24.02	3	2.04	47697
85	P51884	LUM	Lumican	22.22	1	2.06	38429
86	P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta	24.27	1	2.24	15998
87	Q01518	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	22.22	7	2.24	51902
88	Q8TCJ2	STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	32.66	1	2.27	93674
89	Q14254	FLOT2	Flotillin-2	21.45	2	2.43	47064
90	E7EMK3	E7EMK3	Flotillin	21.45	2	2.43	53137
91	P08133	ANXA6	Annexin A6	29.97	3	2.51	75873
92	P18124	RL7	60S ribosomal protein L7	34.71	4	2.56	29226
93	P27824	CALX	Calnexin	32.46	2	2.87	67568
94	P31939	PUR9	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	23.1	1	3.05	64616
95	P13645	K1C10	Keratin type I cytoskeletal 10	31.11	1	3.08	58827
96	P40429	RL13A	60S ribosomal protein L13a	37.28	1	3.22	23577
97	J3QR09	J3QR09	Ribosomal protein L19	39.35	2	3.27	23135
98	J3KTE4	J3KTE4	Ribosomal protein L19	39.35	2	3.27	23248
99	P84098	RL19	60S ribosomal protein L19	39.35	2	3.27	23466
100	P62701	RS4X	40S ribosomal protein S4 X isoform	20.62	1	3.94	29598
101	O75955	FLOT1	Flotillin-1	21.04	2	4.89	47355

No.	Uniprot Accession	Protein Symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
102	Q9Y5M8	SRPRB	Signal recognition particle receptor subunit beta	29.24	1	5.69	29702
103	Q02543	RL18A	60S ribosomal protein L18a	49.26	1	5.78	20762
104	M0R117	M0R117	60S ribosomal protein L18a	49.26	1	5.78	18079
105	M0R3D6	M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment)	49.26	1	5.78	16715
106	M0R1A7	M0R1A7	60S ribosomal protein L18a	49.26	1	5.78	17477
107	P49327	FAS	Fatty acid synthase	29.73	1	6.39	273424
108	P61626	LYSC	Lysozyme C	22.09	2	6.73	16537
109	F8W32	F8W32	Lysozyme	22.09	2	6.73	11488
110	A0A0B4J259	A0A0B4J259	Lysozyme	22.09	2	6.73	15329

5. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากกรณีศึกษาตัวอย่างโปรเกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides Matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
1	P35527	K1C9	Keratin type I cytoskeletal 9	29.79	2	0.26	62064
2	A0A2R8YD50	A0A2R8YD50	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	23.15	1	0.28	76838
3	P51659	DHB4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	23.15	1	0.28	79686
4	Q9BRR6	ADPGK	ADP-dependent glucokinase	29.81	1	0.29	54089
5	P06576	ATPB	ATP synthase subunit beta mitochondrial	20.47	1	0.29	56560
6	P27824	CALX	Calnexin	23.33	4	0.4	67568
7	P45880	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	24.68	1	0.43	31567
8	P46977	STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	29.98	2	0.45	80530
9	P04844	RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	39.12	7	0.47	69284
10	Q9Y5M8	SRPRB	Signal recognition particle receptor subunit beta	26.49	2	0.47	29702

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides Matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
11	P02751	FINC	Fibronectin	33.38	11	0.48	272318
12	P02452	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain	26.26	1	0.48	138942
13	Q9NZ01	TECR	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	28.94	2	0.49	36034
14	P40925	MDHC	Malate dehydrogenase cytoplasmic	34.52	2	2	36426
15	P61160	ARP2	Actin-related protein 2	32.97	3	2.04	44761
16	X1WI28	X1WI28	60S ribosomal protein L10 (Fragment)	23.36	1	2.05	22975
17	P27635	RL10	60S ribosomal protein L10	23.36	1	2.05	24604
18	A0A087WV22	A0A087WV22	60S ribosomal protein L10	23.36	1	2.05	20439
19	F8W7C6	F8W7C6	60S ribosomal protein L10	23.36	1	2.05	18565
20	P50991	TCPD	T-complex protein 1 subunit delta	22.68	2	2.05	57924
21	O00560	SDCB1	Syntenin-1	30.8	1	2.08	32444
22	P61247	RS3A	40S ribosomal protein S3a	23.14	2	2.09	29945
23	P52566	GDIR2	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	22.47	2	2.1	22988
24	Q02543	RL18A	60S ribosomal protein L18a	32.3	1	2.12	20762
25	M0R117	M0R117	60S ribosomal protein L18a	32.3	1	2.12	18079
26	M0R3D6	M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment)	32.3	1	2.12	16715
27	M0R1A7	M0R1A7	60S ribosomal protein L18a	32.3	1	2.12	17477
28	P22087	FBRL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	28.65	2	2.12	33784
29	G5EA09	G5EA09	Syndecan binding protein (Syntenin) isoform CRA_a	21.41	1	2.15	34819
30	O00303	EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	28.43	1	2.17	37564
31	Q9JEU0	VTI1B	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B	21.09	1	2.17	26688
32	O76021	RL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	31.53	1	2.18	54973
33	P05388	RLA0	60S acidic ribosomal protein P0	40.4	2	2.2	34274
34	Q06033	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	39.99	3	2.2	99849
35	Q04760	LGUL	Lactylglutathione lyase	20.09	2	2.21	20778
36	Q00610	CLH1	Clathrin heavy chain 1	31.22	10	2.22	191613

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides Matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
37	A0A087WVQ6	A0A087WVQ6	Clathrin heavy chain	31.22	10	2.22	192057
38	Q09666	AHINK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	29.57	4	2.23	629114
39	P36578	RL4	60S ribosomal protein L4	30.39	5	2.24	47697
40	Q9Y2X3	NOP58	Nucleolar protein 58	24.77	1	2.24	59578
41	Q99832	TCPH	T-complex protein 1 subunit eta	21.52	2	2.24	59367
42	O15144	ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	29.14	2	2.3	34333
43	B1AH80	B1AH80	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (Rho family small GTP binding protein Rac2) isoform CRA_c	29.77	1	2.34	20799
44	P15153	RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	29.77	1	2.34	21429
45	B1AH77	B1AH77	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	29.77	1	2.34	16775
46	K7EJT5	K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	43.7	1	2.35	5083
47	K7EP65	K7EP65	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	43.7	1	2.35	5239
48	K7EK57	K7EK57	Uncharacterized protein	43.7	1	2.35	5734
49	K7ELC4	K7ELC4	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	43.7	1	2.35	9099
50	K7EMH1	K7EMH1	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	43.7	1	2.35	10422
51	K7ER17	K7ER17	60S ribosomal protein L22	43.7	1	2.35	11169
52	P35268	RL22	60S ribosomal protein L22	43.7	1	2.35	14787
53	P62280	RS11	40S ribosomal protein S11	26.47	2	2.4	18431
54	M0QZC5	M0QZC5	40S ribosomal protein S11	26.47	2	2.4	13997
55	Q9BV40	VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8	39.66	2	2.41	11438
56	Q32P28	P3H1	Prolyl 3-hydroxylase 1	43.05	1	2.42	83394
57	P39019	RS19	40S ribosomal protein S19	39.62	2	2.42	16060
58	P18124	RL7	60S ribosomal protein L7	26.03	6	2.43	29226
59	P49368	TCPG	T-complex protein 1 subunit gamma	33.29	2	2.44	60534
60	Q01518	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	29.58	2	2.48	51902
61	P04083	ANXA1	Annexin A1	52.83	4	2.49	38714

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides Matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
62	P62906	RL10A	60S ribosomal protein L10a	27.72	1	2.55	24831
63	P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	21.18	2	2.55	18012
64	P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	47.76	3	2.57	20601
65	P84077	ARF1	ADP-ribosylation factor 1	47.76	3	2.57	20697
66	H0YLF3	H0YLF3	Beta-2-microglobulin (Fragment)	20.8	2	2.59	8498
67	P61769	B2MG	Beta-2-microglobulin	20.8	2	2.59	13715
68	P62266	RS23	40S ribosomal protein S23	37.98	1	2.6	15808
69	P62424	RL7A	60S ribosomal protein L7a	41.55	3	2.62	29996
70	P62913	RL11	60S ribosomal protein L11	30.18	1	2.67	20252
71	P26373	RL13	60S ribosomal protein L13	26.19	2	2.71	24261
72	Q02878	RL6	60S ribosomal protein L6	41.67	8	2.74	32728
73	P30050	RL12	60S ribosomal protein L12	20.05	1	2.77	17819
74	P61313	RL15	60S ribosomal protein L15	32.43	3	2.81	24146
75	P23396	RS3	40S ribosomal protein S3	21.13	3	2.83	26688
76	P60842	IF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	54.36	1	3.02	46154
77	P62899	RL31	60S ribosomal protein L31	34.15	1	3.09	14463
78	B7Z4C8	B7Z4C8	60S ribosomal protein L31	34.15	1	3.09	15119
79	H7C2W9	H7C2W9	60S ribosomal protein L31 (Fragment)	34.15	1	3.09	12820
80	C9JU56	C9JU56	60S ribosomal protein L31 (Fragment)	34.15	1	3.09	13336
81	B7Z4E3	B7Z4E3	60S ribosomal protein L31	34.15	1	3.09	13955
82	A8MUS3	A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	24.66	1	3.14	21916
83	P62750	RL23A	60S ribosomal protein L23a	24.66	1	3.14	17695
84	K7ERT8	K7ERT8	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	24.66	1	3.14	19640
85	K7EJV9	K7EJV9	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	24.66	1	3.14	19374
86	H7BY10	H7BY10	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	24.66	1	3.14	17811
87	Q16531	DDB1	DNA damage-binding protein 1	22.29	1	3.15	126968

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides Matched	Log2 ratio	Average Mass(Da)
88	P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I	25.42	1	3.21	30778
89	O15145	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	20.36	1	3.25	20547
90	P83731	RL24	60S ribosomal protein L24	47.64	1	3.32	17779
91	C9JXB8	C9JXB8	60S ribosomal protein L24	47.64	1	3.32	14369
92	C9JNW5	C9JNW5	60S ribosomal protein L24	47.64	1	3.32	17543
93	P24534	EF1B	Elongation factor 1-beta	42.14	1	3.33	24764
94	Q71UJ9	H2AV	Histone H2A.V	36.11	1	3.38	13509
95	B0YIW2	B0YIW2	Apolipoprotein C-III	29.33	1	3.43	12816
96	P02656	APOC3	Apolipoprotein C-III	29.33	1	3.43	10852
97	P09496	CLCA	Clathrin light chain A	54.31	2	3.66	27077
98	P13010	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	21.11	2	3.74	82705
99	P42766	RL35	60S ribosomal protein L35	23.03	1	3.94	14551
100	P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	40.49	1	4.08	113084
101	P40429	RL13A	60S ribosomal protein L13a	31.23	1	4.26	23577
102	P52272	HNRPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	27.35	1	4.71	77516
103	A0A087X0X3	A0A087X0X3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	27.35	1	4.71	77570
104	P19338	NUCL	Nucleolin	48.4	1	4.74	76615
105	P62805	H4	Histone H4	39.85	4	4.76	11367
106	H0Y4R1	H0Y4R1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment)	32.19	2	4.78	51077
107	P12268	IMDH2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	32.19	2	4.78	55805
108	P46777	RL5	60S ribosomal protein L5	29.39	1	4.85	34363
109	A0A2R8Y6J3	A0A2R8Y6J3	60S ribosomal protein L5 (Fragment)	29.39	1	4.85	27045
110	P61353	RL27	60S ribosomal protein L27	49.88	2	5.1	15798
111	R4GMR5	R4GMR5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	33.1	1	7.11	32552
112	P48556	PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	33.1	1	7.11	39612
113	P06748	NPM	Nucleophosmin	29.62	1	7.17	32575

6. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลา 6 <-> 12

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
1	Q9JN86	G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	22.92	1	0.22	54121
2	Q9Y3U8	RL36	60S ribosomal protein L36	23.04	1	0.23	12254
3	A0A494C017	A0A494C017	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment)	44.71	1	0.26	13154
4	C9JJV6	C9JJV6	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment)	44.71	1	0.26	15864
5	C9JZL8	C9JZL8	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment)	44.71	1	0.26	20379
6	A0A499FIY8	A0A499FIY8	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment)	44.71	1	0.26	22075
7	C9JC07	C9JC07	Myeloid-associated differentiation marker (Fragment)	44.71	1	0.26	28078
8	Q96S97	MYADM	Myeloid-associated differentiation marker	44.71	1	0.26	35274
9	P26373	RL13	60S ribosomal protein L13	37.65	2	0.31	24261
10	O75955	FLOT1	Flotillin-1	29.12	1	0.31	47355
11	P06727	APOA4	Apolipoprotein A-IV	25.32	1	0.31	45399
12	Q02878	RL6	60S ribosomal protein L6	53.96	7	0.32	32728
13	P50995	ANX11	Annexin A11	32.2	3	0.32	54390
14	O14828	SCAM3	Secretory carrier-associated membrane protein 3	26.51	2	0.33	38287
15	P39019	RS19	40S ribosomal protein S19	26.44	2	0.33	16060
16	O60493	SNX3	Sorting nexin-3	26.38	1	0.34	18762
17	O15217	GSTA4	Glutathione S-transferase A4	24.48	1	0.35	25704
18	P14678	RSMB	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	34.16	1	0.36	24610
19	P36578	RL4	60S ribosomal protein L4	28.02	2	0.36	47697
20	Q13263	TIF1B	Transcription intermediary factor 1-beta	24.09	1	0.36	88550
21	A0A3B3ITT5	A0A3B3ITT5	60S ribosomal protein L29	33.7	1	0.37	18512
22	P47914	RL29	60S ribosomal protein L29	33.7	1	0.37	17752
23	P18124	RL7	60S ribosomal protein L7	44.77	6	0.38	29226

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
24	P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	36.84	5	0.38	22783
25	Q9P0L0	VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	24.32	1	0.38	27893
26	O43324	MCA3	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	21.35	1	0.38	19811
27	P53999	TCP4	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	42.65	2	0.39	14395
28	P62424	RL7A	60S ribosomal protein L7a	32.13	3	0.39	29996
29	P54709	AT1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	25.9	1	0.4	31513
30	O14672	ADA10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	24.7	1	0.4	84142
31	P46781	RS9	40S ribosomal protein S9	44.9	2	0.41	22591
32	O76021	RL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	41.97	1	0.41	54973
33	G5EA09	G5EA09	Syndecan binding protein (Syntenin) isoform CRA_a	26.76	1	0.41	34819
34	Q08945	SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	36.48	1	0.42	81075
35	P61353	RL27	60S ribosomal protein L27	32.15	2	0.42	15798
36	P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	28.93	1	0.42	113084
37	P27105	STOM	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	22.4	4	0.42	31731
38	O00560	SDCB1	Syntenin-1	32.31	1	0.43	32444
39	X1W128	X1W128	60S ribosomal protein L10 (Fragment)	29.07	1	0.43	22975
40	P27635	RL10	60S ribosomal protein L10	29.07	1	0.43	24604
41	A0A087WW22	A0A087WW22	60S ribosomal protein L10	29.07	1	0.43	20439
42	F8W7C6	F8W7C6	60S ribosomal protein L10	29.07	1	0.43	18565
43	Q9BPX5	ARP5L	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	31	1	0.44	16941
44	P42766	RL35	60S ribosomal protein L35	27.86	1	0.44	14551
45	P61313	RL15	60S ribosomal protein L15	43.95	3	0.45	24146
46	J3QR09	J3QR09	Ribosomal protein L19	32.26	4	0.46	23135
47	J3KTE4	J3KTE4	Ribosomal protein L19	32.26	4	0.46	23248
48	P84098	RL19	60S ribosomal protein L19	32.26	4	0.46	23466
49	P62805	H4	Histone H4	44.11	6	0.48	11367

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
50	K7EJT5	K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	39.62	1	0.48	5083
51	K7EP65	K7EP65	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	39.62	1	0.48	5239
52	K7EK57	K7EK57	Uncharacterized protein	39.62	1	0.48	5734
53	K7ELC4	K7ELC4	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	39.62	1	0.48	9099
54	K7EMH1	K7EMH1	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	39.62	1	0.48	10422
55	K7ER17	K7ER17	60S ribosomal protein L22	39.62	1	0.48	11169
56	P35268	RL22	60S ribosomal protein L22	39.62	1	0.48	14787
57	Q02543	RL18A	60S ribosomal protein L18a	24.37	1	0.48	20762
58	M0R117	M0R117	60S ribosomal protein L18a	24.37	1	0.48	18079
59	M0R3D6	M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment)	24.37	1	0.48	16715
60	M0R1A7	M0R1A7	60S ribosomal protein L18a	24.37	1	0.48	17477
61	Q07666	KHDR1	KH domain-containing RNA-binding signal transduction-associated protein 1	21.66	1	0.49	48227
62	P02751	FINC	Fibronectin	36.04	10	2.06	272318
63	P07996	TSP1	Thrombospondin-1	28.67	3	2.32	129383
64	P13647	K2C5	Keratin type II cytoskeletal 5	31.93	1	4.29	62378
65	P35908	K22E	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	21.04	1	5.94	65433
66	P35527	K1C9	Keratin type I cytoskeletal 9	30.4	2	7.89	62064

7. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนมนุษย์ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
1	P04844	RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	30.45	1	0.05	69284
2	P04843	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	29.39	1	0.08	68569
3	P68366	TBA4A	Tubulin alpha-4A chain	26.58	1	0.1	49924
4	Q96FN4	CPNE2	Copine-2	24.23	1	0.13	61190
5	P30040	ERP29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	27.25	1	0.14	28993
6	P14625	ENPL	Endoplasmic reticulum resident protein 29	23.46	3	0.14	92469
7	P02751	FINC	Fibronectin	20.83	6	0.15	272318
8	Q8TB61	S35B2	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1	20.05	1	0.15	47515
9	Q15084	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	48.78	2	0.17	48121
10	P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	36.12	2	0.17	56782
11	Q15758	AAAT	Neutral amino acid transporter B(0)	25.87	3	0.17	56598
12	P07237	PDIA1	Protein disulfide-isomerase	40.04	5	0.18	57116
13	Q00839	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	26.39	2	0.19	90585
14	A0A1W2PPS1	A0A1W2PPS1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	26.39	2	0.19	88318
15	P27348	1433T	14-3-3 protein theta	25.12	1	0.19	27764
16	H0Y512	H0Y512	Adipocyte plasma membrane-associated protein (Fragment)	47.2	1	0.21	45414
17	Q9HDC9	APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated protein	47.2	1	0.21	46480
18	P11021	BIP	Endoplasmic reticulum chaperone Bip	34.86	8	0.22	72333
19	P25098	ARBK1	Beta-adrenergic receptor kinase 1	27.43	1	0.23	79574
20	P62258	1433E	14-3-3 protein epsilon	34.2	2	0.25	29174
21	P13010	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	27.65	2	0.25	82705
22	Q9NVJ2	ARL8B	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	22.39	1	0.26	21539
23	P13645	K1C10	Keratin type I cytoskeletal 10	29.54	3	0.28	58827

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
24	Q13155	AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	21.76	1	0.29	35349
25	P35579	MYH9	Myosin-9	20.83	9	0.29	226530
26	Q8NG11	TSN14	Tetraspanin-14	23.55	1	0.3	30691
27	P07996	TSP1	Thrombospondin-1	44.35	1	0.31	129383
28	P16284	PECA1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	21.64	2	0.31	82522
29	J3KPF3	J3KPF3	4F2 cell-surface antigen heavy chain	40.68	4	0.35	68101
30	F5GZS6	F5GZS6	4F2 cell-surface antigen heavy chain	40.68	4	0.35	64873
31	P08195	4F2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	40.68	4	0.35	67994
32	P35527	K1C9	Keratin type I cytoskeletal 9	31.51	5	0.39	62064
33	Q99829	CPNE1	Copine-1	27	1	0.4	59059
34	B0QZ18	B0QZ18	Copine-1	27	1	0.4	59718
35	F2Z2V0	F2Z2V0	Copine-1 (Fragment)	27	1	0.4	58634
36	Q10589	BST2	Bone marrow stromal antigen 2	21.56	1	0.4	19769
37	P69905	HBA	Hemoglobin subunit alpha	37.96	1	0.41	15258
38	Q96N76	HUTU	Urocanate hydratase	33.35	1	0.41	74831
39	O15031	PLXB2	Plexin-B2	41.12	2	0.42	205126
40	P04040	CATA	Catalase	24.82	1	0.43	59756
41	P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	24.57	1	0.43	103058
42	Q92542	NICA	Nicastrin	21.36	1	0.47	78411
43	Q9Y490	TLN1	Talin-1	26.29	8	0.48	269765
44	P08575	PTPRC	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	20.07	3	0.48	147486
45	P30273	FCERG	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	31.5	1	0.49	9667
46	P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	20.69	1	0.49	23743
47	P15169	CBPN	Carboxypeptidase N catalytic chain	22.77	2	2.01	52286
48	P39019	RS19	40S ribosomal protein S19	27.56	3	2.05	16060
49	P84090	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	23.66	1	2.05	12259

No.	Uniprot Accession	Protein symbol	Protein name	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
50	P16401	H15	Histone H1.5	32.82	1	2.19	22580
51	P54709	AT1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	24.92	1	2.2	31513
52	Q9BPX5	ARP5L	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	40	1	2.27	16941
53	O15217	GSTA4	Glutathione S-transferase A4	25.41	1	2.29	25704
54	P42766	RL35	60S ribosomal protein L35	20.63	1	2.41	14551
55	P46777	RL5	60S ribosomal protein L5	20.97	3	2.46	34363
56	A0A2R8Y6J3	A0A2R8Y6J3	60S ribosomal protein L5 (Fragment)	20.97	3	2.46	27045
57	A8MUS3	A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	42.6	3	2.5	21916
58	P62750	RL23A	60S ribosomal protein L23a	42.6	3	2.5	17695
59	K7ERT8	K7ERT8	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	42.6	3	2.5	19640
60	K7EJV9	K7EJV9	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	42.6	3	2.5	19374
61	H7BY10	H7BY10	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	42.6	3	2.5	17811
62	Q02878	RL6	60S ribosomal protein L6	22.1	6	2.59	32728
63	P05387	RLA2	60S acidic ribosomal protein P2	21.23	1	2.63	11665
64	P30153	2AAA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	22.28	1	2.76	65309
65	P14678	R SMB	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	20.49	1	3.13	24610
66	P83731	RL24	60S ribosomal protein L24	21.64	2	3.59	17779
67	C9JXB8	C9JXB8	60S ribosomal protein L24	21.64	2	3.59	14369
68	C9JNW5	C9JNW5	60S ribosomal protein L24	21.64	2	3.59	17543

8. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ช่วงเวลาที่ 1 <-> 6

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
1	UPI00004CE457	28.1	2	0.21	43769
2	UPI00004CE7CA	29.2	1	0.23	33687
3	UPI0001AF33AD	27.91	2	0.23	52271
4	UPI000179533E	23.93	7	0.23	41485
5	UPI0005E6C3E9	30.25	1	0.25	65775
6	UPI00019A8777	24.32	3	0.26	79931
7	UPI0005E52096	21.63	2	0.26	113961
8	UPI0001795688	20.31	2	0.26	27034
9	UPI0001AF5BA7	34.65	3	0.27	74484
10	UPI00017952F7	31.15	2	0.28	51216
11	UPI0001AF4B9A	27.14	4	0.28	39025
12	UPI00004CE503	25.87	1	0.28	37047
13	UPI00019A8932	24.15	2	0.28	62952
14	UPI00004CE86A	45.12	4	0.29	45698
15	UPI00004CE63E	47.81	2	0.3	36389
16	UPI0000133507	42.4	2	0.3	37643
17	UPI00004CE839	34.08	6	0.3	42938
18	UPI00019A893B	32.31	6	0.3	67944
19	UPI00019A887A	31.89	3	0.3	28508
20	UPI0001AF7E7E	26.81	1	0.3	53677
21	UPI00064C6E0B	25.46	1	0.3	67238
22	UPI00004CE2FC	24.22	2	0.3	47319
23	UPI00064CD95B	23.92	2	0.3	56135
24	UPI000865F4F6	20.97	1	0.3	53538
25	UPI0001795690	38.5	2	0.31	28592
26	UPI00004CE45B	33.12	5	0.31	61191
27	UPI0001BD8827	30.42	5	0.31	61949
28	UPI0001AF340F	28.58	3	0.31	62152
29	UPI0001AF52EE	24.38	2	0.31	24835
30	UPI00000BC0C5	22.31	2	0.31	34104
31	UPI000160BE30	22.3	3	0.31	55794
32	UPI00000C45E7	42.27	1	0.32	20880
33	UPI00004CE4AC	24.49	1	0.32	51478
34	UPI00004CE3AD	22.26	1	0.32	26506
35	UPI00017955FF	20.77	1	0.32	42995
36	UPI00017952BD	35.04	6	0.33	29377
37	UPI0001AF61E1	32.55	5	0.33	117415
38	UPI00004CE565	31.83	4	0.33	64449
39	UPI00004CE744	29.33	4	0.33	44055

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
40	UPI00004CE28C	22.9	1	0.33	39300
41	UPI00004CE56A	63.8	6	0.34	26880
42	UPI00064CC29A	25.42	4	0.34	33142
43	UPI00004CE8A1	23.65	3	0.34	54158
44	UPI00000C4CC4	22.51	2	0.34	26016
45	UPI00004CE5B4	21.68	3	0.34	55517
46	UPI00064C9D1C	43.77	2	0.35	38900
47	UPI00004CE8AA	33.54	1	0.35	41998
48	UPI000179516A	27.16	1	0.35	45366
49	UPI000179565A	25.08	4	0.35	41470
50	UPI000000392B	23.66	1	0.35	52711
51	UPI00004CE37F	22.8	2	0.35	22878
52	UPI00065A0D35	21.67	4	0.35	97249
53	UPI00019A88D6	20.72	1	0.35	85139
54	UPI00064C77EC	38.54	8	0.36	78008
55	UPI00064CD536	33.01	1	0.36	42235
56	UPI00004CE83A	25.9	5	0.36	77173
57	UPI0001795174	22.14	4	0.36	90753
58	UPI00004CE2D5	21.51	4	0.36	50873
59	UPI00064C54D3	35.85	9	0.37	85081
60	UPI000012DBD6	34.33	3	0.37	23124
61	UPI0001795094	27.21	1	0.37	41952
62	UPI00019A8796	20.82	2	0.37	34843
63	UPI00019A8887	46.5	8	0.39	32806
64	UPI000058F71F	40.48	1	0.39	44509
65	UPI00004CE696	35.72	3	0.39	60481
66	UPI00017952C9	34.33	1	0.39	17001
67	UPI0001795227	30.36	4	0.39	103237
68	UPI00004CE44A	28.36	2	0.39	33654
69	UPI00004CE6A4	22.19	2	0.39	36634
70	UPI00019A87A0	37.37	3	0.4	26959
71	UPI0001AF3B98	36.86	8	0.4	42744
72	UPI00064CC735	31.37	1	0.4	38000
73	UPI00004CE39B	29.47	3	0.4	72116
74	UPI000160BE2E	24.68	2	0.4	50326
75	UPI00017954BD	22.61	4	0.4	45175
76	UPI00017952ED	41.45	2	0.41	30563
77	UPI000058F62E	27.04	1	0.41	18095
78	UPI0001795251	26.99	2	0.41	53473
79	UPI00000C47A0	23.4	1	0.41	16228
80	UPI00004CE310	23.3	2	0.41	31997
81	UPI0001AF7CD3	23.11	2	0.41	48841
82	UPI0005E506BD	34.52	3	0.42	54812

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
83	UPI00064C901E	30.7	1	0.42	40576
84	UPI00004CE938	28.39	2	0.42	26035
85	UPI00019A846A	25.82	3	0.42	59505
86	UPI00000C477C	24.22	8	0.42	28755
87	UPI00004CE654	23.25	2	0.42	92732
88	UPI00004CE498	29.52	1	0.43	46467
89	UPI0001AF37ED	26.29	1	0.43	76284
90	UPI00064CBF27	40.9	1	0.44	86019
91	UPI00064C5402	35.56	1	0.45	56693
92	UPI00000B0594	29.58	2	0.45	23165
93	UPI00004CE4C3	22.68	2	0.45	62117
94	UPI0001AF433B	21.09	1	0.45	52832
95	UPI0002EA181D	21.09	1	0.45	53078
96	UPI00004CE3CE	39.82	7	0.46	20954
97	UPI00004CE5B6	31.06	4	0.46	71575
98	UPI00064CCDD8	23.88	4	0.46	32622
99	UPI00000347DB	21.66	4	0.46	34477
100	UPI00064C61B4	41.71	2	0.47	41256
101	UPI0001795313	36.25	4	0.47	48355
102	UPI00064C9E72	28.81	5	0.47	52175
103	UPI0001AF3F1A	20.34	2	0.47	25253
104	UPI00064C8550	30.03	11	0.48	45505
105	UPI00004CE2AA	27.13	5	0.48	41311
106	UPI00000C4E79	22.43	2	0.48	12798
107	UPI00006E2311	20.48	2	0.48	37221
108	UPI00017956E2	35.48	1	0.49	17476
109	UPI00017955B9	30.52	4	0.49	37459
110	UPI0000135172	25	2	0.49	14124
111	UPI00004CE52B	23.38	1	0.49	41986
112	UPI0000030EB1	30.83	5	0.5	47003
113	UPI000865994E	35.34	3	2	54918
114	UPI000658B778	32.01	3	2.13	10476
115	UPI0000133D1C	31.01	1	2.27	13680
116	UPI0008652E88	27.58	6	2.27	15465
117	UPI00064CA7EA	20.58	2	2.41	11961
118	UPI00004CE4F6	40.08	1	2.43	9377
119	UPI00004CE5D1	21	1	2.51	13484
120	UPI00004CE752	22.23	1	2.56	17186
121	UPI00004CE354	27.67	2	2.59	11392
122	UPI0000126E08	22.52	2	3.63	28085
123	UPI00064CBBB5	47.41	5	5.19	101955
124	UPI00064C8541	40.6	2	6.97	77240

9. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ช่วงเวลาที่ 6 <-> 12

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
1	UPI0000134E7F	27.31	2	0.26	8355
2	UPI00017952B	36.25	1	0.29	11390
3	UPI000865ED7A	28.63	2	0.47	19974
4	UPI00004CE55D	21.56	1	2.01	41308
5	UPI000179565A	26.07	3	2.03	41470
6	UPI00004CE8C9	31.06	7	2.08	16238
7	UPI000012DBD6	39.91	2	2.09	23124
8	UPI0001795227	26.82	4	2.09	103237
9	UPI0001795251	21.15	2	2.1	53473
10	UPI00019A8932	31.48	4	2.11	62952
11	UPI00000C47A0	20.72	1	2.11	16228
12	UPI00004CE83A	20.24	6	2.11	77173
13	UPI00004CE44A	22.43	3	2.14	33654
14	UPI00064C6E0B	21.94	1	2.21	67238
15	UPI00004CE39B	31.58	4	2.23	72116
16	UPI00004CE5B6	34.46	6	2.24	71575
17	UPI00004CE82A	38.51	6	2.25	36001
18	UPI00004CE322	37.95	3	2.28	45995
19	UPI0000590023	35.13	1	2.28	54315
20	UPI0001AF37ED	30.83	1	2.29	76284
21	UPI00004CE30B	21.91	2	2.29	52098
22	UPI00004CE696	28.37	2	2.3	60481
23	UPI000865237B	30.04	5	2.32	113773
24	UPI00004CE45B	34.52	6	2.36	61191
25	UPI00004CE4EA	37.77	5	2.37	60807
26	UPI0001AF5BA7	32.55	6	2.37	74484
27	UPI0001BC928D	25.85	1	2.38	72710
28	UPI00004CE562	28.1	2	2.41	48121
29	UPI00004CE2D5	29.92	3	2.43	50873
30	UPI00019A8777	27.97	3	2.45	79931
31	UPI00004CE565	46.98	3	2.46	64449
32	UPI00017952C9	38.06	1	2.48	17001
33	UPI000179533E	29.4	7	2.48	41485
34	UPI00004CE8A1	23.64	3	2.51	54158
35	UPI00000C45E7	38.9	1	2.52	20880
36	UPI00064C7D5B	29.68	3	2.55	67911
37	UPI00019A893B	35.42	5	2.58	67944
38	UPI00019A846A	20.15	2	2.62	59505
39	UPI00004CE839	25.26	7	2.65	42938

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
40	UPI000179516A	24.77	1	2.7	45366
41	UPI00017955FF	21.6	1	2.73	42995
42	UPI00064C54D3	44.22	11	2.79	85081
43	UPI0002EEB426	29.37	2	2.82	54887
44	UPI00064CBB61	36.91	1	2.95	104197
45	UPI00019A8735	44.58	3	3.1	29883
46	UPI00004CE654	24.67	3	3.11	92732
47	UPI0001AF7E7E	25.96	1	3.18	53677
48	UPI0001AF344F	20.63	2	3.24	84344
49	UPI00064CBF27	43.28	3	3.32	86019
50	UPI0005E52096	28.07	4	3.37	113961
51	UPI00064C5961	20.71	1	4.15	57556
52	UPI0001AF61E1	49.94	7	4.24	117415
53	UPI0001BC9283	34.44	1	4.33	52186
54	UPI00064C97B6	20.29	1	4.46	76892
55	UPI0001AF7E9D	24.93	1	4.59	106361
56	UPI00065A0D35	20.49	4	4.61	97249
57	UPI00004CE746	20.01	1	5.02	32678
58	UPI00064C77EC	27.23	10	7.19	78008

10. ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Label-free quantitation จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PEAKS X+ และฐานข้อมูล Uniprot ของโปรตีนของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ช่วงเวลาที่ 12 <-> 24

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
1	UPI00004CE32E	24.33	1	0.07	15997
2	UPI0005E52096	25.58	2	0.11	113961
3	UPI00064C9E72	40.64	1	0.15	52175
4	UPI00064C7697	37.15	4	0.15	95112
5	UPI00004CE7FE	21.16	1	0.15	43042
6	UPI0001AF5BA7	50.44	3	0.16	74484
7	UPI0001AF7E9D	30.28	1	0.16	106361
8	UPI0001BD8827	25.22	2	0.16	61949
9	UPI00064C54D3	41.14	9	0.17	85081
10	UPI00065A0D35	28.57	2	0.17	97249
11	UPI0001AF61E1	30.26	4	0.18	117415
12	UPI00019A8887	41.44	6	0.2	32806
13	UPI000012DBD6	53.46	2	0.21	23124
14	UPI00004CE2AA	31.05	4	0.21	41311
15	UPI0005E6C3E9	27.53	1	0.21	65775
16	UPI00004CE812	20.91	3	0.21	51741
17	UPI0001795305	30.48	1	0.23	57322
18	UPI00064C8DE6	30.28	2	0.23	49587

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
19	UPI00004CE3AD	24.05	2	0.23	26506
20	UPI000058E2F0	23.14	2	0.23	101122
21	UPI0001AF3EAB	25.89	1	0.24	66423
22	UPI00004CE8C9	30.88	7	0.25	16238
23	UPI00064CCB75	23.53	1	0.25	41798
24	UPI00017955B9	20.54	2	0.25	37459
25	UPI00017952ED	25.71	2	0.26	30563
26	UPI00017952C9	25.1	1	0.26	17001
27	UPI0001AF439E	53.08	2	0.27	18465
28	UPI00004CE45B	43.83	3	0.27	61191
29	UPI00004CE30B	23.25	4	0.27	52098
30	UPI0001AF7E7E	22.94	2	0.27	53677
31	UPI00064C77EC	23.14	10	0.28	78008
32	UPI00064CBB61	32.59	1	0.29	104197
33	UPI00019A893B	32.33	4	0.29	67944
34	UPI00019A88C0	31.33	1	0.29	101403
35	UPI0001BD80DB	29.31	3	0.29	67665
36	UPI00017954BD	23.79	5	0.29	45175
37	UPI00019A8870	23.14	3	0.29	31234
38	UPI0001AF3450	20.37	2	0.29	40965
39	UPI00064CC5DB	48.19	4	0.3	66269
40	UPI00000C4DBA	43.18	2	0.3	24780
41	UPI00004CE839	39.57	5	0.3	42938
42	UPI00004CE7AF	27.49	3	0.3	29305
43	UPI00004CE457	22.24	1	0.3	43769
44	UPI00000C45E7	47.71	1	0.31	20880
45	UPI00000347DB	35.46	2	0.31	34477
46	UPI0001795247	39.43	1	0.32	53919
47	UPI00004CE322	27.71	3	0.32	45995
48	UPI00064CA485	24.96	1	0.32	81280
49	UPI0001CF4AFF	41.47	1	0.33	75875
50	UPI0000030F19	33.03	1	0.33	25113
51	UPI000179556C	32.38	2	0.33	31375
52	UPI000012C021	30.72	4	0.33	18532
53	UPI000058FD9A	22.93	3	0.33	42405
54	UPI00064C61B4	53.56	4	0.34	41256
55	UPI000179565A	52.26	3	0.34	41470
56	UPI00017955A9	36.52	5	0.34	60522
57	UPI0001795159	27.81	4	0.34	74432
58	UPI00004CE5B6	20.75	6	0.34	71575
59	UPI0001AF3B11	40.52	3	0.35	64942
60	UPI00004CE55A	31.49	1	0.35	25794
61	UPI0001AF3F1A	24.92	1	0.35	25253

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
62	UPI0005E42D6D	22.9	6	0.35	48007
63	UPI00017952E3	51.46	3	0.36	42215
64	UPI00004CE92E	31.18	8	0.36	50424
65	UPI000179533E	58.94	8	0.37	41485
66	UPI00004CE3AF	32.48	1	0.37	38373
67	UPI00004CE82A	37.09	6	0.38	36001
68	UPI0001CA7F4F	35.01	2	0.39	41427
69	UPI00064C7B09	31.63	2	0.39	43924
70	UPI0000130A82	29.61	4	0.39	20550
71	UPI00064C7E59	23.35	5	0.39	129949
72	UPI0001795313	22.55	3	0.39	48355
73	UPI00004CE87B	30.83	6	0.4	35761
74	UPI0001795636	30.36	18	0.4	155718
75	UPI00000BC53A	23.31	4	0.4	45332
76	UPI00064C5DC6	38.76	2	0.42	50503
77	UPI0008666885	37.02	9	0.42	114283
78	UPI0000127636	31.75	3	0.42	10287
79	UPI00004CE2A3	24.91	1	0.42	31478
80	UPI0006599E22	22.07	1	0.42	26962
81	UPI000016FC04	21.29	4	0.42	88495
82	UPI00004CE63E	20.49	2	0.42	36389
83	UPI00064C871F	29.95	8	0.43	28919
84	UPI00017950F4	21.06	2	0.43	28059
85	UPI0001AF3B22	20.81	6	0.43	50416
86	UPI00004CE26F	20.55	1	0.43	15444
87	UPI00004CE8E6	44.89	2	0.44	30708
88	UPI00019A8889	25.7	2	0.44	37545
89	UPI00004CE801	21.42	3	0.44	41954
90	UPI00004CE7AE	21.28	2	0.44	36129
91	UPI00004CE565	43.8	3	0.45	64449
92	UPI00000BAA07	37.67	4	0.45	37940
93	UPI00004CE89C	30.45	3	0.45	30359
94	UPI0005E506BD	27.28	1	0.45	54812
95	UPI00004CE43B	25.06	11	0.45	57091
96	UPI0001AF346C	20.07	11	0.46	28732
97	UPI00004CE44C	25.33	1	0.47	15703
98	UPI00017953E4	23.19	7	0.47	33912
99	UPI0000134BBA	37.25	2	0.48	11807
100	UPI00004CE37F	28.34	3	0.48	22878
101	UPI00004CE313	27.78	1	0.48	19767
102	UPI00004CE82F	24.1	4	0.48	20379
103	UPI00000C446D	22.01	1	0.48	27691
104	UPI00004CE76A	33.22	1	0.49	27410

No.	Uniparc Accession	Significance	Peptides matched	Log2 ratio	Average mass(Da)
105	UPI00004CE4AC	25.55	1	0.49	51478
106	UPI00019A897A	25.24	4	0.49	18922
107	UPI00017952F7	37.87	2	0.5	51216
108	UPI00004CE829	57.6	2	2.03	13775
109	UPI00004CE55F	29.88	5	2.03	50079
110	UPI000012A349	42.46	1	2.05	15514
111	UPI00004CE3CB	24.15	1	2.21	21188
112	UPI00004CE2EA	32.94	1	2.27	9320
113	UPI00004CE5B8	20.03	6	2.29	19449
114	UPI000865994E	49.63	5	2.85	54918
115	UPI000179570D	30.58	3	2.93	59361
116	UPI00004CE454	23.27	3	3.45	28451
117	UPI00004CE83B	32.76	3	3.7	17645
118	UPI0000126E08	29.88	3	3.84	28085
119	UPI00004CE354	31.19	3	4.02	11392
120	UPI00004CE8E5	23.2	1	4.17	36324
121	UPI00004CE7A7	37.03	7	4.44	31528
122	UPI0000134E7F	31.91	2	5.49	8355
123	UPI00038FACCC	23.44	1	5.66	9253
124	UPI00000B6F1A	40.23	5	6.38	35840



ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้ากับ FBS ที่ผ่านการ inactivated ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปฏิชีวนะ 1X สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ 1X เจนตามัยซิน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ปริมาณ 18.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำการละลายให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พักให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงและทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS)

ชั่งผง PBS ปริมาณ 9.6 กรัม ละลายด้วยน้ำ MilliQ ปริมาตร 1 ลิตร ทำการละลายให้เข้ากัน นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พักให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงและทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมแผ่นเจล SDS-PAGE ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ทำการผสมน้ำ MilliQ ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร สารละลาย Acrylamide/Bis-acrylamide ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร สารละลาย Tris ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.8 ปริมาตร 2.6 สารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลาย ammonium persulfate (APS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 และสารละลาย Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน และเทใส่ gel cassette โดยเลือกแผ่นกระจกที่มีความลึก 1.5 มิลลิลิตรในการประกอบ gel cassette

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสทรัฐ นันทวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	11 กรกฎาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดตรัง
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 1 จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี การศึกษา 2559 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชา วิทยาศาสตรระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวช ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2560



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY