

ผลของพะไรโอคอลจากเชื้อไวรัสต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด



นายพรหมฉัตร เจริญพัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* -
DERIVED PHTHIOCOL ON INNATE IMMUNE RESPONSES

Mr. Promchat Charoenpat



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของพะโล้โศลกจากเชื้อวัณโรคต่อการตอบสนองของ ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด
โดย	นายพรหมฉัตร เจริญพัฒน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนทร ชุตินทรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ณัฐธิดา หิรัญกาญจน์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.กนิษฐา ภัทรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารีสา พลพวก)

พรหมฉัตร เจริญพัฒน์ : ผลของพะไรโอคอลลจากเชื้อวัณโรคต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิด (EFFECTS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* -DERIVED PHTHIICOL ON INNATE IMMUNE RESPONSES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ทพญ. ดร.พัชรี ฤทธิประจักษ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, หน้า.

พะไรโอคอลล (Phtiocol หรือ Pht) เป็นรงควัตถุควินอยด์ (quinoid pigment) ที่พบในชั้นไขมันในผนังเซลล์ของ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) พะไรโอคอลลเป็นลิแกนด์ที่สามารถจับกับตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีการแสดงออกในเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิดรวมทั้งเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ ในปัจจุบันยังมีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับอธิบายบทบาทของรงควัตถุนี้ต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลโดยตรงของพะไรโอคอลลต่อการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ ในการศึกษาที่ทดสอบด้วยกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกของหนูเม้าส์ด้วยพะไรโอคอลล พบว่าพะไรโอคอลลสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนภายในเดนไดรติกเซลล์ โดยพบการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอน แต่พะไรโอคอลลไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาการสมบูรณ์ของเดนไดรติกเซลล์ได้ พะไรโอคอลลสามารถเหนี่ยวนำการแสดงของ *Cyp1a1* ในแมโครฟาจที่พัฒนาจากไขกระดูกได้เช่นเดียวกับเดนไดรติกเซลล์ นอกจากนี้ พะไรโอคอลลยังมีผลทำให้แมโครฟาจเปลี่ยนสภาพเป็นแมโครฟาจคล้าย M2 (M2-like macrophage) โดยพบว่าพะไรโอคอลลเหนี่ยวนำแสดงออกของยีน *Arg1* และ *IL10* และการหลั่งไซโตไคน์ IL-10 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การติดเชื้อแบบแฝงจะมีการเพิ่มขึ้นของแมโครฟาจชนิด M2 ซึ่งมีบทบาทในการ ยับยั้งการสร้างแกรนูโลมา ทำให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมและกำจัดเชื้อได้และมีผลให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงมากขึ้น ดังนั้นพะไรโอคอลล จึงอาจเป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่ *M. tuberculosis* ใช้ในการหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและนำไปสู่การติดเชื้อแฝงได้

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5687139020 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: PHTHIOL / MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS / DENDRITIC CELL /
MACROPHAGE / ARYL HYDROCARBON RECEPTOR

PROMCHAT CHAROENPAT: EFFECTS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* -
DERIVED PHTHIOL ON INNATE IMMUNE RESPONSES. ADVISOR: PATCHAREE
RITPRAJAK, D.D.S., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D.,
pp.

Phthiol (Pht) is a quinoid pigment found in the lipid layer of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. Phthiol is a ligand of aryl hydrocarbon receptor (AhR) which expressed in various immune cells, including dendritic cell and macrophage. At present, there are a few data of the role of this pigment on innate immune cells. Thus, this work aims to study the direct effect of Pht-derived *M. tuberculosis* on dendritic cell and macrophage. In this studies, when bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were stimulated with Pht, we found that AhR was activated, leading to the expression of the AhR target gene, *Cyp1a1*. However, Pht was not able to induce DC maturation. Consistently, Pht induced the expression of *Cyp1a1* via AhR in murine bone marrow-derived macrophages. In addition, Pht induced M2-like phenotype by the induction of *Arg1* and *Il10* mRNA expression, and IL-10 production. It has been demonstrated that in latent tuberculosis, macrophages polarized into M2 which inhibits granulomatous responses, and consequently elevates the disease severity. Thus, our findings suggest that Pht may be one of the immune evasion mechanisms of *M. tuberculosis* causing latent infection.

Field of Study: Medical Microbiology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิประจักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำวิทยานิพนธ์รวมถึงการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ในหลักสูตรสหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ทุกท่านที่คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ หน่วยปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ และศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ รวมทั้งรุ่นพี่ เพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ

ขอขอบพระคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทยที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบคุณบิดา มารดา ทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2	4
ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 วัณโรคและเชื้อวัณโรค	4
2.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและพยาธิกำเนิดของวัณโรค	5
2.3 สารพะไรโอคอลล.....	7
2.4 ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน	8
2.5 บทบาทของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในเซลล์ภูมิคุ้มกัน	11
2.6 ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune response) และ เซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells).....	12
2.7 เดนไดรติกเซลล์	13
2.8 แมโครฟาจ	14

บทที่ 3	16
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	16
3.1 สัตว์ทดลอง.....	16
3.2 การเตรียมเซลล์ไขกระดูก	16
3.3 การเตรียมเดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิจากเซลล์ไขกระดูก.....	16
3.4 การเตรียมแมโครฟาจปฐมภูมิจากเซลล์ไขกระดูก.....	17
3.5 การเตรียมสารพะไรโอคอล	17
3.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cellular toxicity) ด้วยเอ็มทีที (MTT assay).....	18
3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)	18
3.8 การวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ	19
3.9 การเตรียม complementary DNA (cDNA preparation)	19
3.10 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเชิงปริมาณ (Quantitative PCR).....	20
3.11 การวิเคราะห์โมเลกุลที่เฉพาะบนผิวเซลล์ด้วย Flow cytometry.....	22
3.12 การวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งจากเซลล์ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	23
3.13 Western blot.....	23
3.13.1 การเตรียมโปรตีนจากเซลล์	23
3.13.2 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay	24
3.13.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot	24
3.13.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนชนิด phosphorylated p38 (p-p38) และ p38.....	24
3.14. การวิเคราะห์ทางสถิติ	25
บทที่ 4	26

ผลการทดลอง	26
4.1 ผลของสารพะไรโอคอลต่อเดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิที่พัฒนาจากไขกระดูกของหนูเมาส์	26
4.1.1 ความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อเดนไดรติกเซลล์	26
4.1.2 ผลของพะไรโอคอลต่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย Cyp1a1	27
4.1.3. ผลของพะไรโอคอลต่อการพัฒนาการสมบูรณ์ของเดนไดรติกเซลล์ (DC maturation).....	28
4.1.4 ผลของพะไรโอคอลร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ต่อการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์	30
4.2 ผลของพะไรโอคอลต่อแมโครฟาจปฐมภูมิที่พัฒนาจากไขกระดูกของหนูเมาส์	33
4.2.1 ความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อแมโครฟาจ	33
4.2.2 ผลของพะไรโอคอลต่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ AhR Cyp1a1	34
4.2.3 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกของโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ (Surface marker) ในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ	35
4.2.4 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกระดับยีนในกลุ่ม M1,M2 ของแมโครฟาจ.....	37
4.2.5 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ	41
4.2.6. ผลของพะไรโอคอลต่อการผลิตไซโตไคน์ IL-10 ของแมโครฟาจผ่านวิถีสัญญาณ p38.....	43
บทที่ 5	44
อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง	44
.....	47
รายการอ้างอิง	47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	21
--	----



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนสภาพแมโครฟาจในการเกิดแกรนูโลมา.....	6
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของพะไรโอคอกอลและโครงสร้างสามมิติของ AhR.....	7
ภาพที่ 3 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของลิแกนด์ที่จำเพาะต่อตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน.....	8
ภาพที่ 4 วิธีสัญญาณ canonical.....	10
ภาพที่ 5 การแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนใน innate immune cells และ adaptive immune cells.....	12
ภาพที่ 6 การพัฒนาของแมโครฟาจ (Macrophage polarization).....	14
ภาพที่ 7 ร้อยละความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพะไรโอคอกอลในปริมาณต่าง ๆ ...	26
ภาพที่ 8 การแสดงออกของยีน <i>Cyp1a1</i> ในเดนไดรติกเซลล์.....	27
ภาพที่ 9 ผลของพะไรโอคอกอลต่อการแสดงออกของโค-สติมูลาทอรีโมเลกุลและโมเลกุล MHC บนผิวของเดนไดรติกเซลล์.....	29
ภาพที่ 10 ผลของพะไรโอคอกอลร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์.....	32
ภาพที่ 11 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพะไรโอคอกอลในปริมาณต่าง ๆ ...	33
ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน <i>Cyp1a1</i> ในแมโครฟาจ.....	34
ภาพที่ 13 ผลของพะไรโอคอกอลต่อการแสดงออกของ costimulatory molecule บนผิวของแมโครฟาจ .	36
ภาพที่ 14 ผลของพะไรโอคอกอลต่อการเปลี่ยนสภาพของยีนในแมโครฟาจเป็น M1.....	38
ภาพที่ 15 ผลของพะไรโอคอกอลต่อการเปลี่ยนสภาพของยีนแมโครฟาจเป็น M2.....	40
ภาพที่ 16 ผลของพะไรโอคอกอลต่อการหลั่งไซโตไคน์ของแมโครฟาจ.....	42
ภาพที่ 17 ผลของพะไรโอคอกอลต่อวิธีสัญญาณ p38 ในแมโครฟาจ.....	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรคเป็นโรคติดต่ออันดับต้นๆ ที่เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญในประเทศไทย โดยมี *Mycobacterium tuberculosis* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดวัณโรคในมนุษย์ ซึ่งในผนังเซลล์ *M. tuberculosis* มีปัจจัยความรุนแรงก่อให้เกิดโรค (virulence factor) หลายปัจจัย เช่น โพรตีน, กรดไขมัน, คลอโรสเตอรอล และกรดไมโคลิก (mycolic acid) เป็นต้น [1] ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการรุกรานระบบภูมิคุ้มกันของ *M. tuberculosis*

พะไรโอคอลล (Phtiocol หรือ Pht) เป็นรงควัตถุควินอยด์ (quinoid pigment) ที่พบในชั้นไขมันในผนังเซลล์ของ *M. tuberculosis* [2] พะไรโอคอลลเป็นปัจจัยความรุนแรงก่อให้เกิดโรค มีผลต่อกระบวนการรีดอกซ์ของเซลล์ (cellular redox states) [3] และการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen) ทำให้เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) สูญเสียการทำงาน [4] วิถีสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcriptional activation) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งแปลกปลอม (xenobiotic-metabolizing enzymes) อันได้แก่ ไซโทโครม พี 450 1 เอ 1 (cytochrome P450, family 1, member A1; *Cyp1a1*), ไซโทโครม พี 450 1 เอ 2 (cytochrome P450, family 1, member A2; *Cyp1a2*) และไซโทโครม พี 450 1 บี 1 (cytochrome P450, family 1, member B1; *Cyp1b1*) เพื่อกำจัดสารแปลกปลอม [5] ในปี ค.ศ. 2014 Moura-Alves และคณะ [6] พบว่ารงควัตถุพะไรโอคอลลเป็นลิแกนด์ของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน (Aryl hydrocarbon receptor หรือ AhR) ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่ในไซโตพลาสซึม จากการศึกษาดังกล่าวตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนได้ถูกระบุว่าเป็น PRR (pattern recognition receptor) ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ในการต้านวัณโรค อาริลไฮโดรคาร์บอนมีการแสดงออกในเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น นิวโทรฟิล เบโซฟิล อีโอซิโนฟิล แมสเซลล์ ทีเซลล์ เดนไดรติกเซลล์ และแมโครฟาจ [7] นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมา

พบว่าหนูทดลองที่ไม่มียีนตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนมีความไวต่อการติด *Helicobacter hepaticus* [8], *Pseudomonas aeruginosa* [6] และ *M. tuberculosis* [9] ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในกลไกการป้องกันการติดเชื้อ

เดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันต้นกำเนิด (innate immunity) ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells) ซึ่งเดนไดรติกเซลล์สามารถกระตุ้นทีเซลล์ได้โดยตรงและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของทีเซลล์ (T cell differentiation) และในขณะที่แมโครฟาจ ทำหน้าที่หลักในหลั่งสารการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 (IL-6), ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF- α) และผลิตไนตริกออกไซด์ (iNOS) ซึ่งนำไปสู่กระบวนการกำจัดเชื้อและต่อต้านวัณโรค ซึ่งเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจเป็นตัวกลางสำคัญในการกำจัดแบคทีเรียผ่านคุณสมบัติของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity)

จากที่กล่าวมาข้างต้นนั้นในเดนไดรติกเซลล์และเซลล์แมโครฟาจมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณของพะไรโอคอกคิลที่ผลิตจากเชื้อวัณโรค แต่บทบาทและหน้าที่ของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจไม่ได้ได้รับการศึกษาที่ชัดเจน รวมทั้งยังไม่มีหลักฐานว่าพะไรโอคอกคิล เกี่ยวข้องกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ดังนั้นโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของพะไรโอคอกคิลในการกระตุ้นและฟังก์ชันของเดนไดรติกเซลล์และเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งการศึกษานี้จะให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของวัณโรคเพื่อการพัฒนาวิธีการบำบัดและป้องกันวัณโรคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

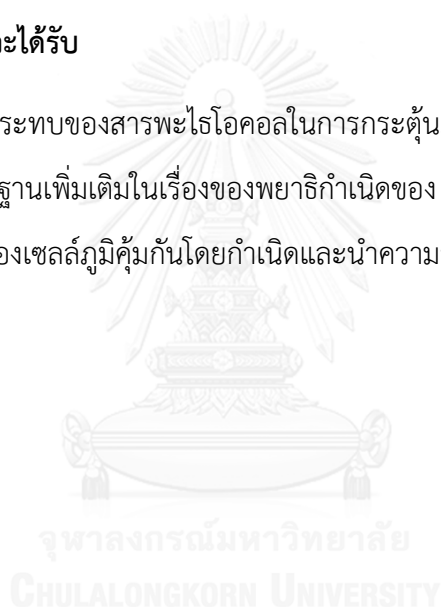
เพื่อศึกษาผลของพะไรโอคอกคิลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพเดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์ (Bone marrow-derived dendritic cells หรือ BMDCs) และแมโครฟาจปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์ (Bone marrow-derived macrophage หรือ BMDMs)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาสารพะไรโอคอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ
- 1.3.2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ของเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ เมื่อกระตุ้นด้วยสารพะไรโอคอล เพื่อบ่งบอกสถานะของเดนไดรติกเซลล์และชนิดของแมโครฟาจ
- 1.3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนในแมโครฟาจ เมื่อกระตุ้นด้วยสารพะไรโอคอล
- 1.3.4 ศึกษาการวิถีสัญญาณในแมโครฟาจ เมื่อกระตุ้นด้วยพะไรโอคอล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงผลกระทบของสารพะไรโอคอลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด
- 1.4.2 ได้ความรู้พื้นฐานเพิ่มเติมในเรื่องของพยาธิกำเนิดของ *M. tuberculosis* และการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาในทางคลินิกต่อไป



บทที่ 2

ปรีทรรคนั้วรณกรรรม

2.1 วัณโรคและเชื้อวัณโรค

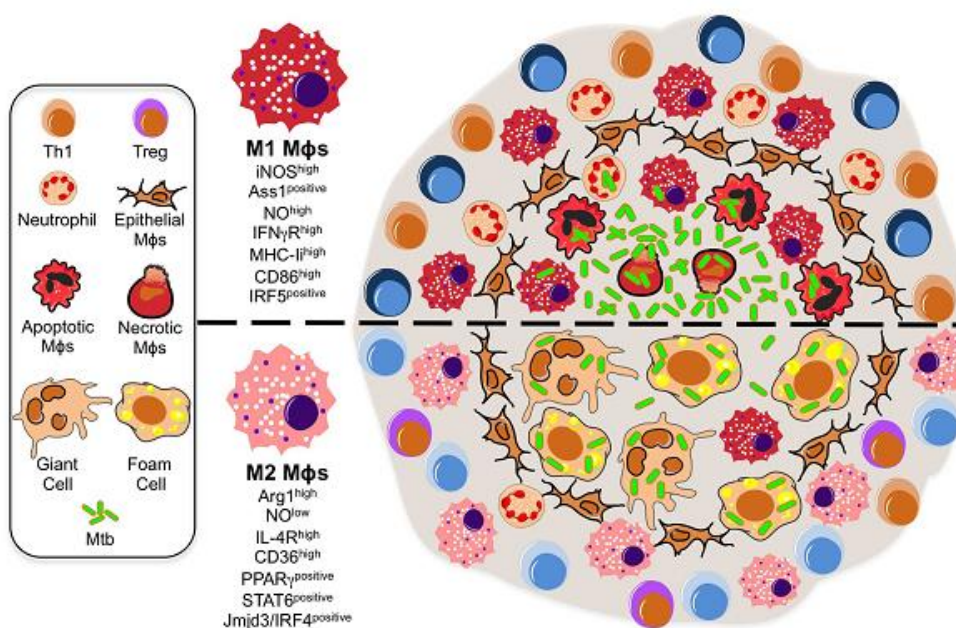
วัณโรคเป็นโรคเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 2 ของโรคติดเชื้อ ซึ่งปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลกและประเทศไทย ในปี 2012 องค์การอนามัยโรคได้ประกาศว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผู้ป่วยวัณโรคสูงสุดเป็นอันดับที่ 22 ของโรค แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดวัณโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis* โดยการแพร่กระจายผ่านระบบทางเดินหายใจ *M. tuberculosis* เป็นเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะทรงแท่งค่อนข้างยาว ติดสี แกรมบวก เจริญเติบโตช้า ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์และเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถแบ่งตัวได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เจ้าบ้าน (facultative intracellular bacteria) [10] อย่างไรก็ตาม *M. tuberculosis* มีปัจจัยความรุนแรงก่อให้เกิดโรค (virulence factor) หลายปัจจัย รวมถึงผนังเซลล์เชื้อ *M. tuberculosis* เช่น โปรตีน, กรดไขมัน, คลอโรสเตรอล และกรดไมโคลิก (mycolic acid) [1] และพะไรโอคอล (Phthiocol) ซึ่งเป็นรงควัตถุควินอยด์ (quinoid pigment) ที่พบในชั้นไขมันในผนังเซลล์ของ *M. tuberculosis* [2] โดยการศึกษาล่าสุดพบว่า *M. tuberculosis* ถูกตรวจจับโดยเซลล์ภูมิคุ้มกันผ่านตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน และมีการศึกษาเพิ่มเติมในหนูทดลองที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนพบว่าหนูทดลองติดเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ง่ายและมีอัตราการรอดลดลงอย่างรุนแรง นอกจากนี้ในหนูทดลองที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* ยังพบความบกพร่องของการหลั่ง TNF- α และการเพิ่มขึ้นของเคโมไคน์ชนิด CCL2, CCL3 และ CCL5 อีกด้วยเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งแม้ว่าจะมีการหลั่ง leukocyte-attracted chemokines เพิ่มขึ้นแต่จำนวนเซลล์นิวโทรฟิลลดลงอย่างเห็นได้ชัด [6] อย่างไรก็ตามยังไม่มีคำตอบที่ชัดเจนว่าวิถีสัญญาณของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนมีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำการหลั่งเคโมไคน์และ neutrophil recruitment อย่างไร

2.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและพยาธิกำเนิดของวัณโรค

เมื่อ *M. tuberculosis* เข้าสู่ร่างกายจะมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune response) โดยอาศัยการรับรู้ปัจจัยความรุนแรงที่ก่อให้เกิดโรคของ *M. tuberculosis* ผ่านตัวรับสัญญาณ pattern recognition receptor (PRRs) เช่น Toll-like receptor (TLR) และ C-type lectin receptor (CLR) เป็นต้น [11] โดยตัวรับ Toll-like receptor (TLR) เป็นตัวรับที่สำคัญในการรับรู้การรุกรานของ *M. tuberculosis* ตัวอย่างเช่น TLR2 สามารถจับกับไกลโคลิพิด (glycolipid), TLR4 สามารถจับกับ HSP65 kDa และ โปรตีนกลุ่ม heat labile ที่ผลิตจากเชื้อและ TLR9 สามารถจับ DNA ของ *M. tuberculosis* เป็นต้น [12] ซึ่งเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดที่สำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *M. tuberculosis* คืออัลวีโอลาร์แมโครฟาจ (alveolar macrophages) และเดนไดรติกเซลล์ เป็นต้น เมื่อมีการรุกรานของ *M. tuberculosis* เซลล์อัลวีโอลาร์แมโครฟาจ (alveolar macrophages) และเดนไดรติกเซลล์จะมีการผลิตไซโตไคน์และคีโมไคน์เพื่อกำจัดเชื้อและเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune response) ต่อไป

นอกจาก *M. tuberculosis* มีปัจจัยความรุนแรงที่ก่อให้เกิดโรคที่หลากหลายแล้ว *M. tuberculosis* ยังมีความสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกัน โดยการยับยั้งการรวมตัวของฟาโกไลโซโซม (Phagolysosome fusion) [13] อีกทั้งสามารถมีชีวิตอยู่รอดภายในและสามารถเพิ่มจำนวนภายในอัลวีโอลาร์แมโครฟาจ (alveolar macrophages) และเดนไดรติกเซลล์ [14, 15] จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ *M. tuberculosis* มีการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นอัลวีโอลาร์แมโครฟาจ (alveolar macrophages) จึงมีการผลิตไซโตไคน์ เช่น TNF และคีโมไคน์ เช่น CXCL9, CXCL10 ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมของเซลล์เดนไดรติกและนิวโทรฟิลรวมไปถึงลิมโฟไซต์ จนนำไปสู่การเกิดแกรนูโลมา (granuloma formation) เพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ นำไปสู่การยับยั้งการเจริญของเชื้อและกระตุ้นกลไกการกำจัดเชื้อในที่สุด [16] และส่งผลให้เกิดการติดเชื้อวัณโรคแฝง (latent TB) ซึ่งการเกิดแกรนูโลมาในการติดเชื้อระยะแรกแมโครฟาจจะพัฒนาเป็นแมโครฟาจ ชนิด M1 เพื่อหลั่งสารการอักเสบและเอนไซม์ในตริกออกไซด์ อีกทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมของนิวโทรฟิลและลิมโฟไซต์ แต่ในการติดเชื้อระยะปลายแมโครฟาจจะพัฒนาเป็นแมโครฟาจ ชนิด M2 ซึ่งจะหลั่งไซโตไคน์ต่อต้านการอักเสบและยับยั้งการผลิตเอนไซม์ในตริกออกไซด์ นอกจากนี้ อาจก่อให้เกิดการรวมตัวของ Foam cell และ multinucleated giant cells ซึ่งจะทำให้เซลล์

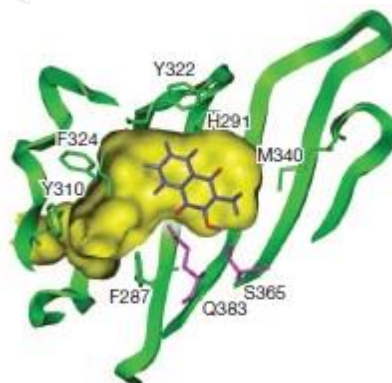
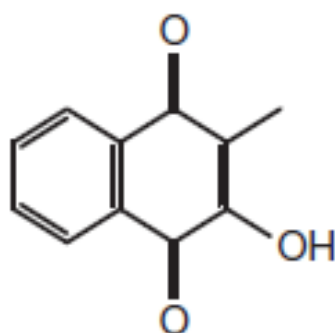
สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น [17, 18] เนื่องจากใน Foam cell มีแหล่งของคอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อ รวมถึงยับยั้งการรวมตัวของนิวโทรฟิล ซึ่งอาจจะทำให้การแตกออกของแกรนูโลมาและนำไปสู่การติดเชื้อวัณโรคอีกครั้ง (active TB) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนสภาพแมโครฟาจในการเกิดแกรนูโลมา [18]

2.3 สารพะไรโอคอลล

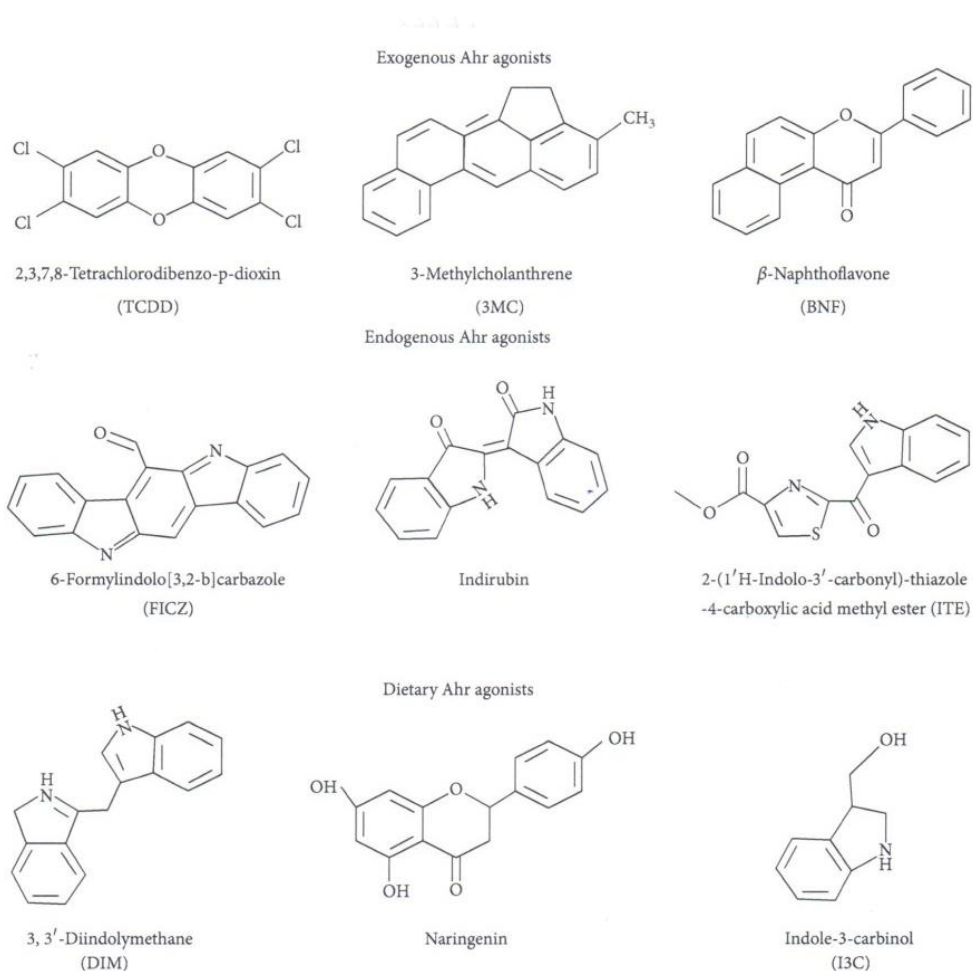
สารพะไรโอคอลลเป็นเป็นรงควัตถุควินอยด์ (quinoid pigment) โดยมีชื่อทางเคมีคือ 2-methyl-3-hydroxy-1,4 naphthoquinone ($C_{11}H_8O_3$) และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงเบนซีน 2 วงต่อกัน [2, 6] (ภาพที่ 2) โดยมีลักษณะเป็นผลึกเหลี่ยมสีเหลือง [2, 6] และในศึกษาที่ผ่านมา พบว่าพะไรโอคอลลเป็นปัจจัยความรุนแรงก่อให้เกิดโรคมะเร็งต่อกระบวนการรีดอกซ์ของเซลล์ (cellular redox states) [3] และการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen) ทำให้เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) สูญเสียการทำงาน [4] และเมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยยืนยันว่าสารพะไรโอคอลลที่ได้มาจาก *M. tuberculosis* เป็นลิแกนด์ของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน ซึ่งการจับกันของพะไรโอคอลลกับตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนถูกเหนี่ยวนำผ่านพันธะไฮโดรเจน โดยโปรตอนจากตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนย้ายไปจับกับพะไรโอคอลล



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของพะไรโอคอลลและโครงสร้างสามมิติของ AhR [6]

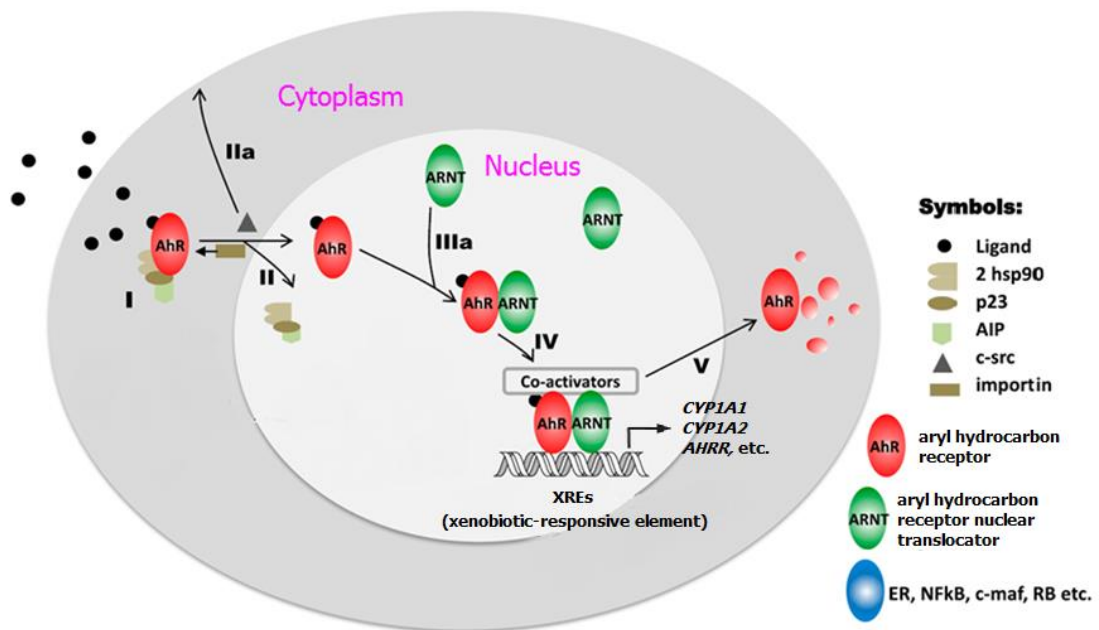
2.4 ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน

ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนเป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่ในไซโทพลาสซึม ซึ่งพบการแสดงออกมากในเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [19] ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนสามารถจับกับสารแปลกปลอมในกลุ่มไดออกซินและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs), benzo (a) pyrene, 3-methylcholanthrene, benzantracenes, benzoflavones, และสารจากธรรมชาติ เช่น ทริปโตแฟน photoproducts, quercetin ในแอลเบิ้ล, resveratrol ในไวน์แดง, ขมิ้นชัน เป็นต้น [19, 20] (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของลิแกนด์ที่จำเพาะต่อตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน[21]

การส่งทอดสัญญาณของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนสามารถชักนำผ่าน 2 ทาง คือวิถีสัญญาณ canonical และ non-canonical ซึ่งจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลิแกนด์ [19] ซึ่งกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนจะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับโปรตีน chaperone, HSP90 (90-kDa heat shock protein), ARA9 (AhR-associated protein 9, AIP หรือ XAP2) และ p23 ในการส่งสัญญาณ canonical (ภาพที่ 4) เมื่อตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนจับกับลิแกนด์จะมีการเปลี่ยนโครงสร้างของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน และเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสและจะแยกตัวออกจากโปรตีน chaperone ไปสร้าง heterodimer กับโปรตีน ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) กลายเป็น AhR-ARNT complexes และไปจับกับบริเวณ specific enhancer sequences, dioxin responsive elements (DREs) หรือ xenobiotic responsive elements (XREs) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcriptional activation) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งแปลกปลอม (xenobiotic-metabolizing enzymes) อันได้แก่ไซโทโครม พี 450 1 เอ 1 (cytochrome P450, family 1, member A1; *Cyp1a1*), ไซโทโครม พี 450 1 เอ 2 (cytochrome P450, family 1, member A2; *Cyp1a2*) และไซโทโครม พี 450 1 บี 1 (cytochrome P450, family 1, member B1; *Cyp1b1*), เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส (glutathione S transferases; Gst), Udpgt (uridine diphospho-glucuronosyltransferases), Nqo1 (NAD(P)H-dependent quinone oxydoreductase-1) และ Aldh3a1 (aldehyde dehydrogenase 3A1) เป็นต้น [7, 20, 22] โดยเอนไซม์ *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ถูกเหนี่ยวนำเพื่อใช้ในการ metabolize สารแปลกปลอมและทำให้ความเป็นพิษลดลง [23]



ภาพที่ 4 วิธีสัญญาณ canonical [5]

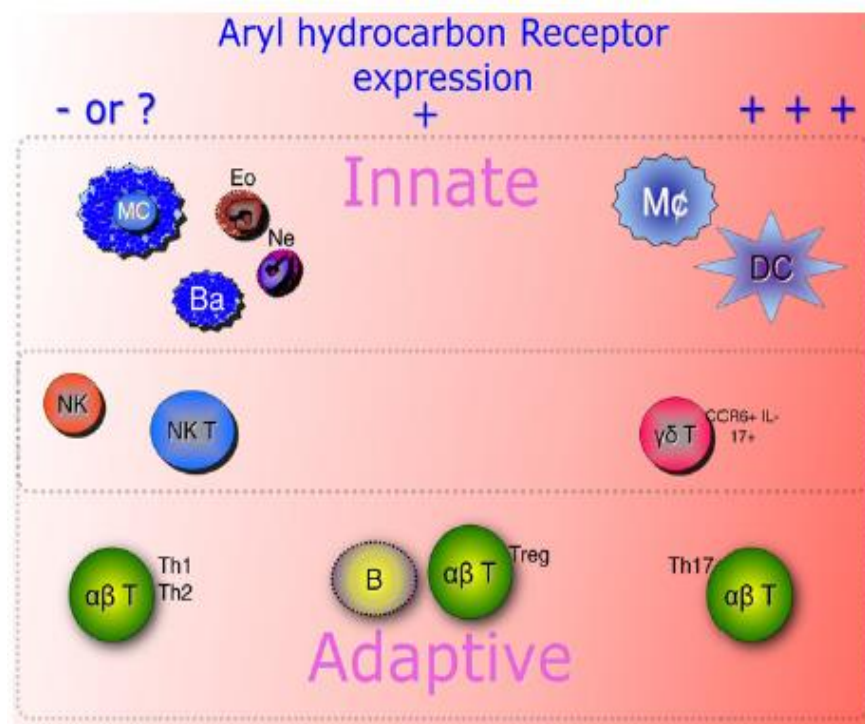
เมื่อไม่นานมานี้มีการระบุวิธีสัญญาณ non canonical โดย AhR สามารถจับกับโปรตีนจากวิธีสัญญาณอื่น เช่นภายในนิวเคลียส AhR สามารถจับกับ hypophosphorylated retinoblastoma ส่งผลทำให้ยับยั้งการพัฒนาจาก G1 phase ไปสู่ S phase ในวัฏจักรของเซลล์ [24] และ AhR ยังสามารถจับกับ STAT1 ทำให้เกิดการกระตุ้นใน NF- κ B [25] นอกจากนี้ AhR ยังสามารถจับกับ estrogen receptor (ER), the transcription factor E2F1 , NF- κ B RelA และ RelB ซึ่ง downstream targets ของ canonical และ non-canonical มีความแตกต่างกัน เช่น การส่งสัญญาณผ่านวิธีสัญญาณ canonical ก่อให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ interleukin 2 แต่ในกรณีที่ผ่านส่งสัญญาณผ่านวิธีสัญญาณ non canonical เป็นการกระตุ้นสัญญาณผ่าน RelB ไปยัง Target ยีนของ interleukin 8 [5] นอกจากนี้การกระตุ้นและการทำงานของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลิแกนด์ affinity ปริมาณของลิแกนด์และความจำเพาะของเซลล์แต่ละชนิด [5, 19]

2.5 บทบาทของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในเซลล์ภูมิคุ้มกัน

ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนมีการแสดงออกในเซลล์ภูมิคุ้มกันต่างๆ เช่น นิวโทรฟิล เบโซฟิล ฮีโอซิโนฟิล mast cell ทีเซลล์ เดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ [7] ซึ่งการพัฒนาของอวัยวะน้ำเหลืองและภูมิคุ้มกันบกพร่องมีการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ไม่มีตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน [26, 27] นอกจากนี้สัตว์ทดลองที่ไม่มีตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนยังมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อฉวยโอกาสเช่น *Helicobacter hepaticus* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นข้อบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน [8] ตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในทีเซลล์มีส่วนร่วมในการพัฒนาของทีเซลล์ ซึ่ง TCDD จะเหนี่ยวนำการทำงานของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนทำให้เกิดการกระตุ้น regulatory T cells ทำให้เกิดการพัฒนาลดน้อยลงในการทดลอง autoimmune encephalomyelitis ในขณะที่การเหนี่ยวนำตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนโดย FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) ทำให้เกิดเพิ่มขึ้นของทีเซลล์ชนิด Th17 โดยการยับยั้งการพัฒนาทีเซลล์ชนิด regulatory T cell [28] และลิแกนด์ benzoimidazole derivative (M50356) ได้รับการศึกษาในการทดลองโมเดลโรคภูมิแพ้และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการพัฒนาของทีเซลล์ชนิด Th 2 แต่กลไกเหล่านี้ยังไม่ได้รับการอธิบาย [5, 19]

2.6 ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune response) และ เซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells)

ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัยการรับรู้ผ่านตัวรับ pattern recognition receptor (PRR) โดยจะจับชิ้นส่วนของเชื้อและสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) และภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเป็นภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว แต่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดได้แก่ นิวโทรฟิล (Neutrophils) , Natural killer cells, แมโครฟาจและเดนไดรติกเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนมากในเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจ (ภาพที่ 5) [7] การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาในแมโครฟาจและเดนไดรติกเซลล์



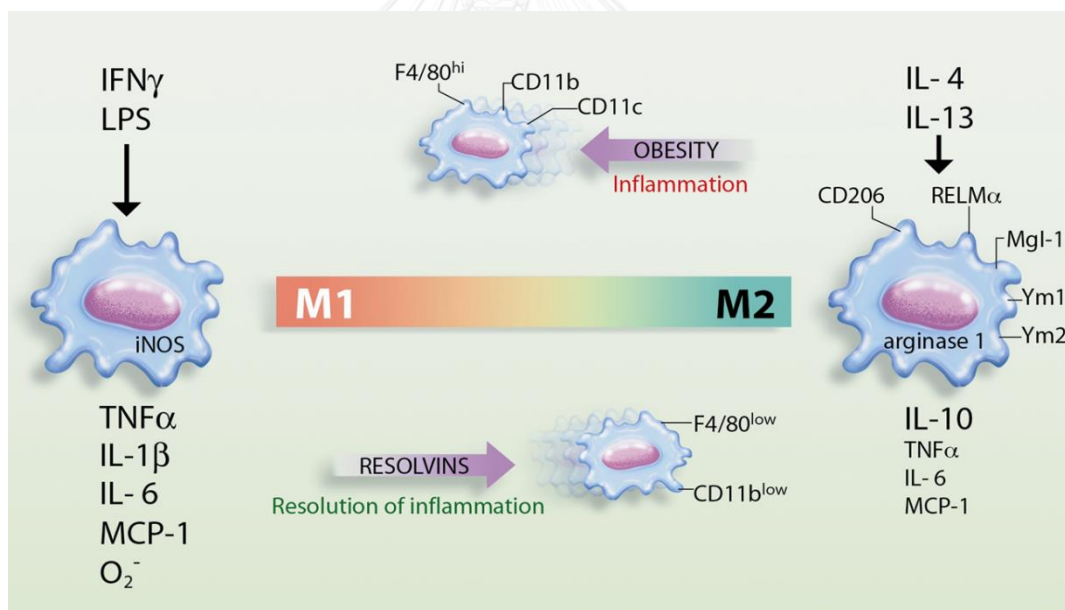
ภาพที่ 5 การแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนใน innate immune cells และ adaptive immune cells [7]

2.7 เดนไดรติกเซลล์

เดนไดรติกเซลล์เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันต้นกำเนิดโดยธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells) ซึ่งเดนไดรติกเซลล์สามารถกระตุ้นทีเซลล์ได้โดยตรงและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของทีเซลล์ (T cell differentiation) และพบการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนที่สูงในเดนไดรติกเซลล์ซึ่ง จึงมีการการศึกษาตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนใน เดนไดรติกเซลล์ที่ผ่านมา พบว่าเมื่อการศึกษาในเซลล์เดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์พบว่า TCDD, LPS และ CpG สามารถเหนี่ยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอน [29] อีกทั้งการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนโดย TCDD ทำให้เกิดการพัฒนาของเดนไดรติกเซลล์ที่เพิ่มขึ้น [30] และในการศึกษาเซลล์เดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์ที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนแสดงให้เห็นว่ามีการผลิต interleukin 10 ลดลงซึ่งเป็นไปได้ว่าจะได้รับการควบคุมและส่งสัญญาณผ่าน RelB และในปัจจุบันเซลล์เดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์ที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS พบว่ามีการมีการลดลงของยีนที่ควบคุมการอักเสบรวมทั้งยีนที่สำคัญเช่น *Cyp1a1*, *Cox2*, *Cebp β* (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta) and *Ido* (Indoleamine 2,3-dioxygenase) [31] และในการส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B signaling พบว่ามีความเชื่อมโยงกับการแสดงออกของ IDO ในเดนไดรติกเซลล์และพบว่าการพัฒนาของ regulatory T cell ที่เพิ่มขึ้น [32]

2.8 แมโครฟาจ

แมโครฟาจเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันต้นกำเนิดโดยธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells) โดยแมโครฟาจสามารถพัฒนาได้เป็น 2 ชนิดคือแมโครฟาจชนิด M1 (classically activated macrophages ; M1 macrophages) แมโครฟาจชนิดนี้สามารถหลั่งสารการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เช่น *Interleukin-6* (IL-6) , *Tumor necrotic factor-a* (TNF-a) และผลิต nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งนำไปสู่กระบวนการกำจัดเชื้อ และแมโครฟาจชนิด M2 (alternatively activated macrophages; M2 macrophages) เป็นแมโครฟาจที่ยับยั้งการสร้างสารการอักเสบ โดยการผลิต anti-inflammatory cytokine เช่น *interleukin-10* (IL-10), *transforming growth factor beta* (TGF- β) และผลิตเอนไซม์ *arginase 1* เป็นต้น [33]



ภาพที่ 6 การพัฒนาของแมโครฟาจ (Macrophage polarization) [34]

จากการศึกษาตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในแมโครฟาจที่ผ่านมาพบว่าในแมโครฟาจที่พัฒนาในห้องปฏิบัติการมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในเซลล์แมโครฟาจทั้ง 2 ชนิดคือแมโครฟาจชนิด M1 (classically activated M ϕ) และ แมโครฟาจชนิด M2 (alternatively activated M ϕ) [35] อีกทั้งการศึกษาในแมโครฟาจชนิด peritoneal ที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่ามีการผลิต IL-6, IL-12 และ TNF- α [25] นอกจากนี้เซลล์แมโครฟาจปฐมภูมิจากไขกระดูกของหนูเมาส์ที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนมีการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ลดลง [28] และมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า CpG เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงตัวรับสัญญาณออกอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในเซลล์แมโครฟาจแต่ไม่ได้รับการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ และเป็นที่น่าสนใจคือการจับกับของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนกับ STAT1 ถูกพบได้เฉพาะในการกระตุ้นแมโครฟาจด้วย LPS แต่กับไม่พบในการกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วย CpG [25] นอกจากนี้มีการทำงานร่วมกันของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนกับ Pai-2 (plasminogen activator inhibitor-2) ในการตอบสนองด้วยการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และกลไกนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับ NF- κ B pathway [28] และการกระตุ้นสัญญาณผ่าน TLR ผ่าน IRF4 ทำให้เกิดการ polarization ของเซลล์แมโครฟาจไปเป็นแมโครฟาจชนิด M2 [36] และในการศึกษาการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในเซลล์แมโครฟาจของมนุษย์พบว่ามีความผิดปกติของกลไกแคแทบอลิซึมของวิตามินดี [37, 38]

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานและการรายงานเกี่ยวกับพะไรโอคอลต่อฟังก์ชันของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอน อีกทั้งในเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณของพะไรโอคอลที่ผลิตจากเชื้อวัณโรค แต่บทบาทและหน้าที่ของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในเดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจไม่ได้รับการศึกษาที่ชัดเจน ดังนั้นกลไกภายในเซลล์และโมเลกุลภายในเซลล์ของการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนยังคงต้องได้รับการอธิบาย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ เพศเมีย อายุ 5-8 สัปดาห์ สายพันธุ์ Balb/c ซึ่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งสัตว์ทดลองที่ส่งจะถูกกักกันที่ศูนย์สัตว์ทดลองคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขั้นตอนการกระทำใดๆ เกี่ยวกับสัตว์ทดลองยึดหลักการตามแนวทางปฏิบัติการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IACUC) และตามแบบฟอร์มเสนอโครงการวิจัยการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ และได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่โครงการ คสท.22/2558)

3.2 การเตรียมเซลล์ไขกระดูก

เซลล์ไขกระดูก (Bone marrow cell) เตรียมจากหนูเม้าส์ เพศเมีย สายพันธุ์ Balb/c ซึ่งถูกทำการุณยฆาตโดยวิธี cervical dislocation จากนั้นผ่าเก็บกระดูกต้นขาหลัง และกระดูกบริเวณขาหน้า และนำมาแยกเซลล์ไขกระดูก นับจำนวนเซลล์และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสำหรับเตรียมเซลล์เดนไดรตริกปฏุมภูมิ และ และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสำหรับการเตรียมเซลล์แมโครฟาจปฏุมภูมิ

3.3 การเตรียมเดนไดรตริกเซลล์ปฏุมภูมิจากเซลล์ไขกระดูก

นำเซลล์ไขกระดูกที่เตรียมจากวิธีที่ระบุในข้อ 3.2 นำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Gibco, Germany) ที่ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum (Gibco, Germany), 0.2 นาโนโมลาร์ L-glutamax, 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) penicillin/streptomycin (Hyclone, UK), 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร rGM-CSF (Prepotech) และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร rIL-4 (Prepotech) และเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตรและบ่มเซลล์ที่ตู้เลี้ยงเซลล์บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 2, 4 และ 6 เมื่อครบ 7 วัน เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารที่ต้องการศึกษาและนำไปศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการตอบสนองและการทำงานของเซลล์

3.4 การเตรียมแมโครฟาจปฐมภูมิจากเซลล์ไขกระดูก

นำเซลล์ไขกระดูกที่เตรียมจากวิธีที่ระบุในข้อ 3.2 39 มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum (FBS), 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) sodium pyruvate (Gibco, Germany), 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) HEPES (Hyclone, UK), 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V) penicillin/streptomycin, 5 เปอร์เซ็นต์ equine serum (Hyclone, UK) และ 20 เปอร์เซ็นต์ (V/V) L929- M-CSF conditioned medium ที่ผลิตจากเซลล์ L929 (ATCC CCL1) และเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร บ่มเซลล์ที่เลี้ยงเซลล์บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และในวันที่ 7 เก็บเซลล์และนับจำนวนเซลล์และปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรลงเซลล์และเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 12 หลุม เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะถูกกระตุ้นด้วยสารที่ต้องการศึกษาและนำไปศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการตอบสนองและการทำงานของเซลล์

3.5 การเตรียมสารพะไรโอคอล

นำสารพะไรโอคอลความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมันนี ละลายใน DMSO (Amresco, USA) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.025, 0.50 และ 0.125 โมลลาร์

3.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cellular toxicity) ด้วยเอ็มทีที (MTT assay)

เลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 2.0×10^5 เซลล์ต่อหลุมสำหรับเดินไครติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกและ 5.0×10^4 เซลล์ต่อหลุมสำหรับแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก จากนั้นกระตุ้นด้วยพะไรโอคอลที่มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ และเติมเมธิลไธโอซอลเตตราโซเลียม (Methylthiazol Tetrazolium หรือ MTT) (Invitrogen, USA) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปบ่มเซลล์ที่ตู้เลี้ยงเซลล์บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับไครติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกและ 4 ชั่วโมง แมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก จากนั้นกำจัดเอ็มทีทีออกโดยการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) 2 ครั้ง จะสังเกตเห็นผลึกฟอร์มazan จากนั้นเติมไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Amresco, USA) หลุมละ 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan และนำไปวัดค่าความทึบแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรและนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดดังนี้

$$\text{ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าค่าการดูดกลืนแสงชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุม}}$$

3.7 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

อาร์เอ็นเอถูกเก็บเมื่อครบเวลากระตุ้น โดยใช้ Trizol (Invitrogen, USA) 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดเป่า เพื่อให้เซลล์แตกและนำมาใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าด้วย Vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บส่วนใสด้านบนนำไปใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกับตั้งทิ้งไว้ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน เพื่อเพิ่มประมาณตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้งและเติม 75 เปอร์เซ็นต์เอทานอล เพื่อล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้าด้วย Vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อระเหยเอทานอลออก หลังจากนั้นเติมน้ำ DEPC 20 ไมโครลิตรลงนำไป

บ่มที่ 55-60 องศาเซลเซียส 10 นาทีเพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ และตัวอย่างอาร์เอ็นเอถูกนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส

3.8 การวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอจากข้อ 3.6 2 ไมโครลิตรทำให้เจือจางในน้ำ (PCR grade) 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex จากนั้นนำ 2 ไมโครลิตรมาวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ ที่ค่าความดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific, USA) และนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นปริมาณอาร์เอ็นเอ จากสูตร

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40$ (ปริมาณอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรได้ 1 หน่วย) และความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการทดลองควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 โดยคำนวณจากค่าความดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตรส่วนด้วย 280 นาโนเมตร

3.9 การเตรียม complementary DNA (cDNA preparation)

สังเคราะห์ complementary DNA โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบย้อนกลับ (reverse transcriptase-PCR) โดยนำอาร์เอ็นเอจากข้อ 3.6 1 ไมโครกรัมมาใช้เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template) ผสมกับ 5X iScript RT Supermix (Bio-rad, USA) 4 ไมโครลิตรในหลอดพีซีอาร์และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอไซด์ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที , 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและนำ cDNA ที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.10 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาอูทโงโฟลิมอเรสเชิงปริมาณ (Quantitative PCR)

นำ cDNA จากข้อที่ 3.8 ใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการศึกษาปริมาณแสดงออกของยีน *Cyp1A1*, *Il6*, *Il10*, *Arg1*, *Ym1*, *iNos*, *Tgfb1* และ *Gapdh* ด้วยวิธี qPCR โดยเตรียม qPCR master mix ประกอบด้วย 5 ไมโครลิตร 2X iTaq™ universal SYBR® Green supermix (Bio-rad, USA), 0.5 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ชนิด forward, 0.5 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ชนิด reverse และน้ำปราศจากอาร์เอ็นเอส 3 ไมโครลิตร เติม qPCR master mix 8 ไมโครลิตรลงใน real time PCR plate จากนั้นเติม cDNA 2 ไมโครลิตรและผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง LightCycler 480 System (Roche Applied Science) โดยกำหนดโปรแกรมทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ pre-incubation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40-50 รอบ ซึ่งการศึกษาปริมาณแสดงออกของยีนใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และคำนวณการแสดงของยีนสัมพันธ์ (relative expression) โดยนำค่า CT ที่ได้มาคำนวณค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ชนิดของไพรเมอร์	Primer sequence
<i>Cyp1a1</i>	Forward	5' – CAATGAGTTTGGGGAGGTTACTG-3'
	Reward	5' – CCCTTCTCAAATGTCCTGTAGTG-3'
<i>NOS2</i>	Forward	5' – CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'
	Reward	5' – CATTGGAAGTGAAGCGTTTTCG -3'
<i>Arginase-1</i>	Forward	5' – AGACCACAGTCTGGCAGTTG-3'
	Reward	5' – CCACCCAAATGACACATAGG-3'
<i>Ym1</i>	Forward	5' – CATGAGCAAGACTTGCGTGAC-3'
	Reward	5' – GGTCCAAACTTCCATCCTCCA-3'
<i>Il6</i>	Forward	5' – CCAGAAACCGCTATGAAGTTCC-3'
	Reward	5' – TTGTCACCAGCATCAGTCCC-3'
<i>Il10</i>	Forward	5' – GAAGCTGAAGACCCTCAGGA-3'
	Reward	5' – TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3'
<i>Tgfb1</i>	Forward	5' – CCTGAGTGGCTGTCTTTTGACG -3'
	Reward	5' – AGTGAGCGCTGAATCGAAAGC -3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5' – ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'
	Reward	5' – ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3'

3.11 การวิเคราะห์โมเลกุลที่เฉพาะบนผิวเซลล์ด้วย Flow cytometry

เมื่อครบเวลากระตุ้น เก็บเซลล์โดยใช้ที่ขูดเซลล์ (cell scraper) ขูดเก็บเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นดูส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์เก็บไว้ ปั่นล้างเซลล์ด้วย FAC buffer 1 ครั้ง ดูส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง เติม 100 ไมโครลิตร FACs buffer ที่มี anti-mouse CD16/32 monoclonal antibody (mAb) (Biolegend) ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย FACs buffer 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง เติม 100 ไมโครลิตร FACs buffer ที่มีแอนติบอดีที่สนใจศึกษา ได้แก่ anti-CD11c-APC mAb (biolegend), anti-CD80-FITc mAb (Biolegend), anti-CD86-PE mAb (eBioscience), anti-mouse I-A/I-E-PerCP/Cy5.5 mAb (Biolegend), anti-mouse F4/80-FITc mAb (Biolegend), anti-mouse CD11b-PE mAb (Biolegend), anti-mouse CD206-PE (Biolegend) ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ในที่มีด เมื่อครบเวลานำไปปั่นล้างด้วย FACs buffer 2 ครั้งและนำไปอ่านผล แต่สำหรับ anti-mouse CD206-PE นั้นเมื่อย้อมแอนติบอดีที่สนใจศึกษาบนผิวเซลล์ตามวิธีข้างต้นที่กล่าวมา หลังจากการล้างครั้งสุดท้ายเติมน้ำยา Fix/Perm 200 ไมโครลิตรนำไป Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ในที่มีด จากนั้นปั่นล้างด้วยน้ำยา perm wash 2 ครั้ง ดูส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง เติม 100 ไมโครลิตร FACs buffer ที่มี anti-mouse CD206-PE ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ในที่มีด เมื่อครบเวลานำไปปั่นล้างด้วย perm wash 2 ครั้งและอ่านผลด้วยเครื่อง *FACS Calibur* Flow cytometry (BD Bioscience) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience) หรือโปรแกรม Flowjo

3.12 การวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจากเซลล์ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

นำ Culture supernatant มาตรวจหาปริมาณไซโตไคน์ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งใช้ชุดทดสอบของ Biolegend ในการทดสอบ โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต กล่าวคือ ตรึงแอนติบอดีที่สนใจบนจาน 96 หลุม โดยใช้ Coating buffer ที่ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย washing buffer และบล็อกพื้นผิวจานด้วย assay diluted บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3-5 ครั้งและเติม Culture supernatant และสารมาตรฐานลงไปในแต่ละหลุมทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาล้างด้วย washing buffer และเติม detection antibody ลงไปที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืดและล้างออกด้วย washing buffer และเติม streptavidin-HRP ลงไปที่ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในที่มืดเมื่อครบเวลาล้างออกด้วย washing buffer จากนั้นเติมซับสเตรทลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10-30 นาทีในที่มืดเติมกรดซัลฟิวริก เพื่อหยุดปฏิกิริยาและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.13 Western blot

3.13.1 การเตรียมโปรตีนจากเซลล์

แม่โครฟาถูกกระตุ้นเซลล์ด้วยสารพะไรโอคอกอล เมื่อครบเวลากระตุ้นดูอาหารเลี้ยง เซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ ประมาณ 1-2 นาทีดูเป่าเพื่อให้เซลล์หลุด ดูดเก็บเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรนำไปปั่น เหยียงที่ความเร็วรอบ 10,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วนใส เนื้อตะกอนใสหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีการ western blot ต่อไป

3.13.2 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ ซึ่งทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน และตัวอย่าง โดยเจือจางในน้ำชนิดปลอดประจุ ซึ่งสารละลาย BSA มาตรฐานจะเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.125, 15.6 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมน้ำลงไปจากแบบ 96 หลุมๆละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นสารละลาย BCA Working Reagent (reagent A 50 ส่วน : reagent B 1 ส่วน) หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานอ้างอิง

3.13.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot

แยกโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเตรียม 12% gel ของ SDS-PAGE และโหลดโปรตีนที่เตรียมใน 6X protein loading dye ในอัตราส่วน 1:5 จากนั้นแยกโปรตีนโดยอาศัยกระแสไฟฟ้าในเจลโพลีเมอร์ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 90 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นย้ายโปรตีนที่อยู่ภายในเจลสู่เมมเบรนชนิด PVDF ด้วยวิธี semi-dry transfer apparatus โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

3.13.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนชนิด phosphorylated p38 (p-p38) และ p38

นำแผ่นเมมเบรน PVDF ที่มีโปรตีนอยู่มา block ด้วย 3% (W/V) skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนไปแช่ในแอนติบอดีที่จำเพาะ p-p38 หรือ p38 หรือ β -actin ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBST ในอัตราส่วน 1:2000 เขย่าที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST 4 ครั้งและเติมแอนติบอดีทุติยภูมิลงไป ในอัตราส่วน 1:4000 บ่มทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย PBST 4-5 ครั้งก่อนนำไปตรวจสอบสัญญาณด้วย chemiluminescence ต่อไป

3.14. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติโดยใช้ Student's t-test หรือ ANOVA โดยมีจำนวนตัวอย่าง $n = 3$ ซึ่งข้อมูลที่แสดงเป็นข้อมูลค่าเฉลี่ย \pm ความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean \pm S.E.M.) โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p < 0.05)



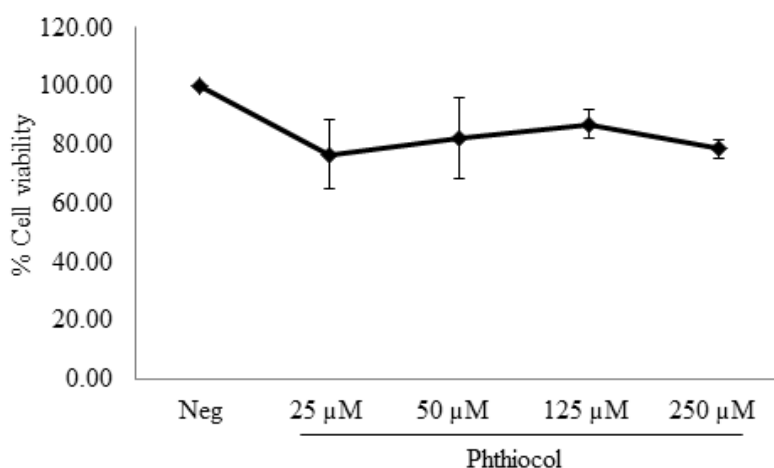
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารพะไรโอคอลต่อเดนไดรติกเซลล์ปฐมภูมิที่พัฒนาจากไขกระดูกของหนูเมาส์

4.1.1 ความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อเดนไดรติกเซลล์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อเดนไดรติกเซลล์ โดยกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่าพะไรโอคอลที่มีความเข้มข้น 25-250 ไมโครโมลาร์ไม่เป็นพิษต่อเดนไดรติกเซลล์ ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบที่ได้รับ DMSO แล้วพบว่าความมีชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วงร้อยละ 70 ถึง 90 (ภาพที่ 6)

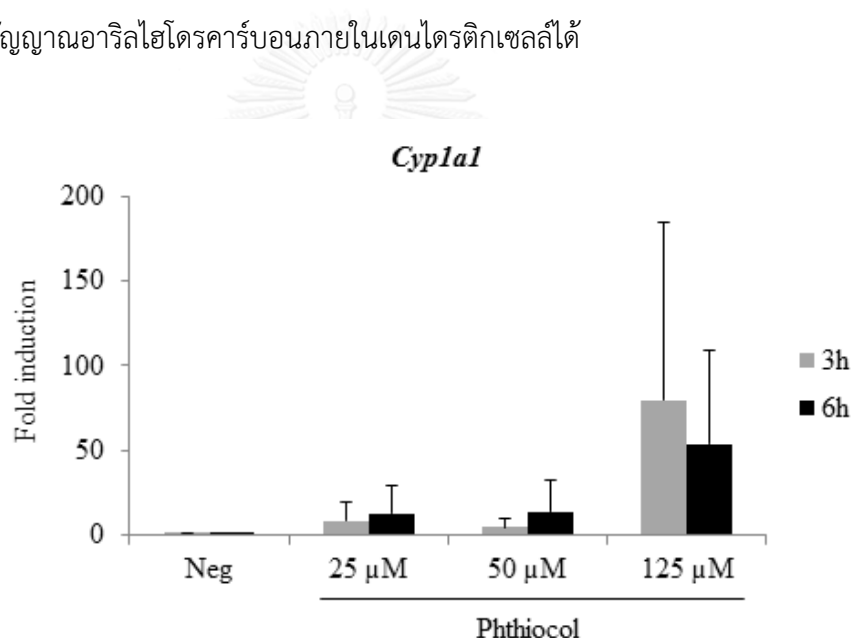


ภาพที่ 7 ร้อยละความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพะไรโอคอลในปริมาณต่าง ๆ

กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ; Neg คือกลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n=3

4.1.2 ผลของพะไรโอคอลต่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *Cyp1a1*

Cyp1a1 เป็นยีนเป้าหมายซึ่งจะมีการแสดงออกเมื่อตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอน ถูกกระตุ้นด้วยลิแกนด์ [6] เพื่อยืนยันว่าพะไรโอคอลสามารถเข้าสู่เดนไดรติกเซลล์และจับกับตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก ด้วยพะไรโอคอลในปริมาณความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* จากผลการทดลองพบว่าที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ด้วยพะไรโอคอลทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ดังภาพที่ 7 ซึ่งแสดงว่าพะไรโอคอลสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนภายในเดนไดรติกเซลล์ได้

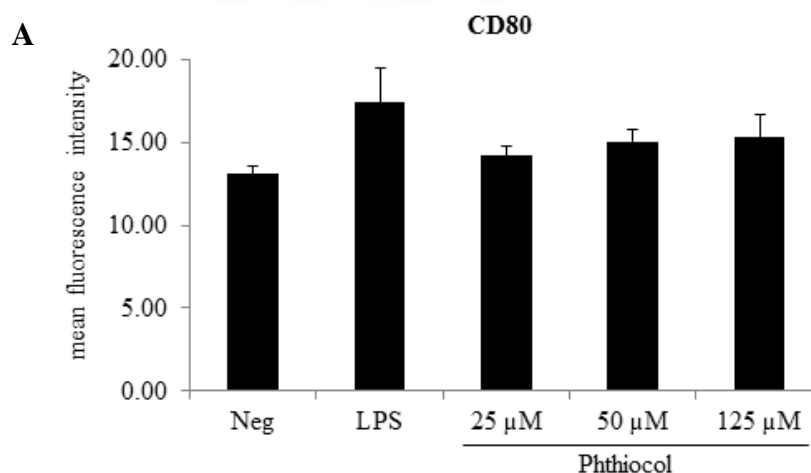


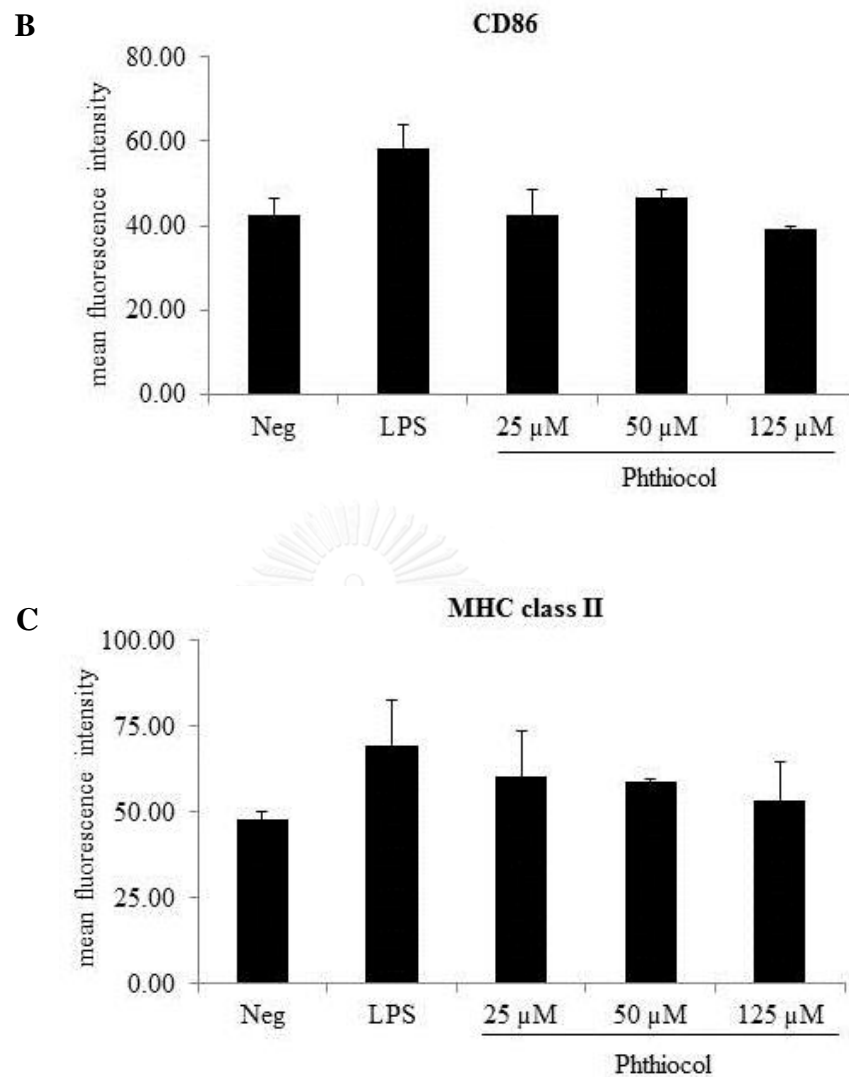
ภาพที่ 8 การแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ในเดนไดรติกเซลล์

กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 3 หรือ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR; แกน Y แสดง fold induction โดยคำนวณ relative mRNA expression ของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนควบคุม (*Gapdh*) ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n= 2

4.1.3. ผลของพะไรโอคอลต่อการพัฒนาการสมบูรณ์ของเดนไดรติกเซลล์ (DC maturation)

พะไรโอคอลสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนภายในเดนไดรติกเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ (Mature DCs) ซึ่งจะมีการแสดงออกของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุล (co-stimulatory molecule) และโมเลกุล MHC ที่มากขึ้นบนผิวเซลล์ของเดนไดรติกเซลล์ เพื่อกระตุ้นทีเซลล์ (T cell activation) และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของทีเซลล์ (T cell proliferation) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารพะไรโอคอลต่อการกระตุ้นการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ โดยการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ ไชกระดูกด้วยพะไรโอคอลในปริมาณความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเก็บเซลล์มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD80, CD86 และ MHC class II ด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรี (Flow Cytometry) จากผลการทดลองพบว่าสารพะไรโอคอลไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD80 (ภาพที่ 8A), CD86 (ภาพที่ 8B) และ MHC class II (ภาพที่ 8C) เพื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบในทุกความเข้มข้นของพะไรโอคอลที่นำมาทดสอบ ซึ่งสรุปได้ว่าพะไรโอคอลไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ผ่านตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนได้



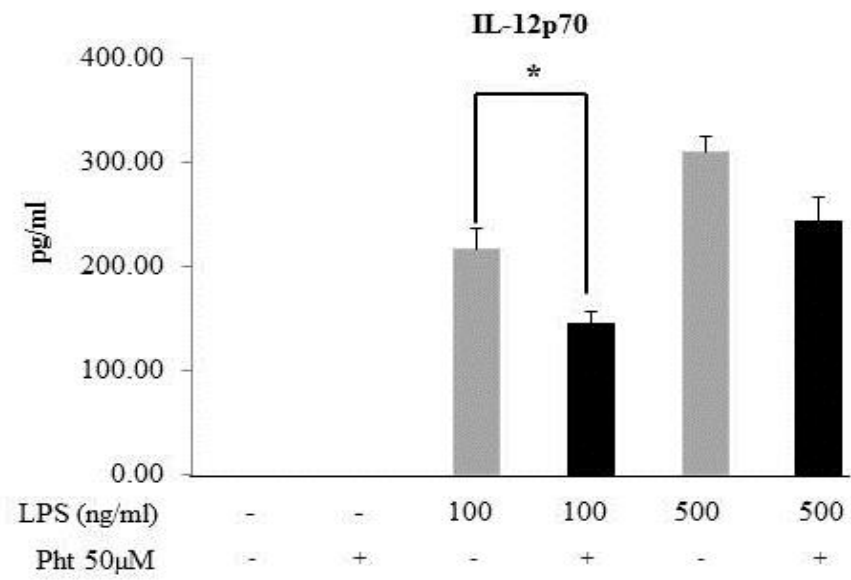
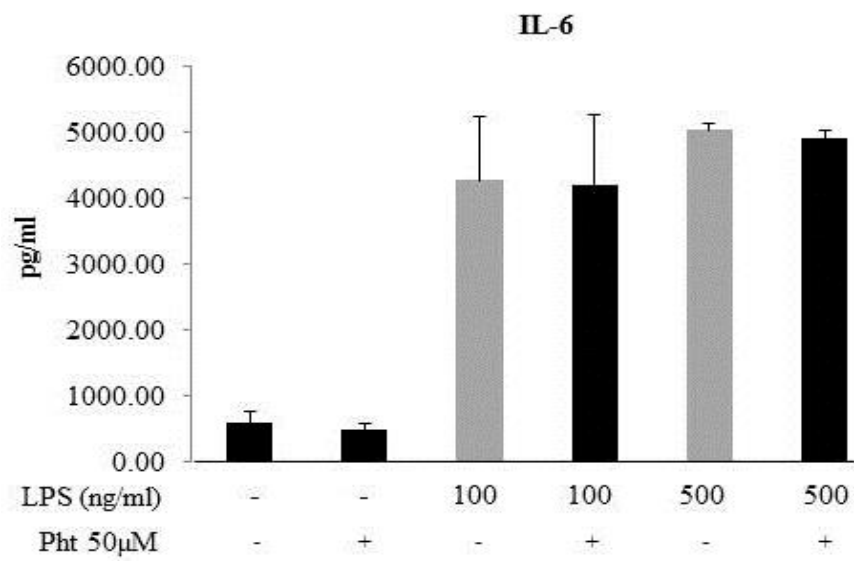


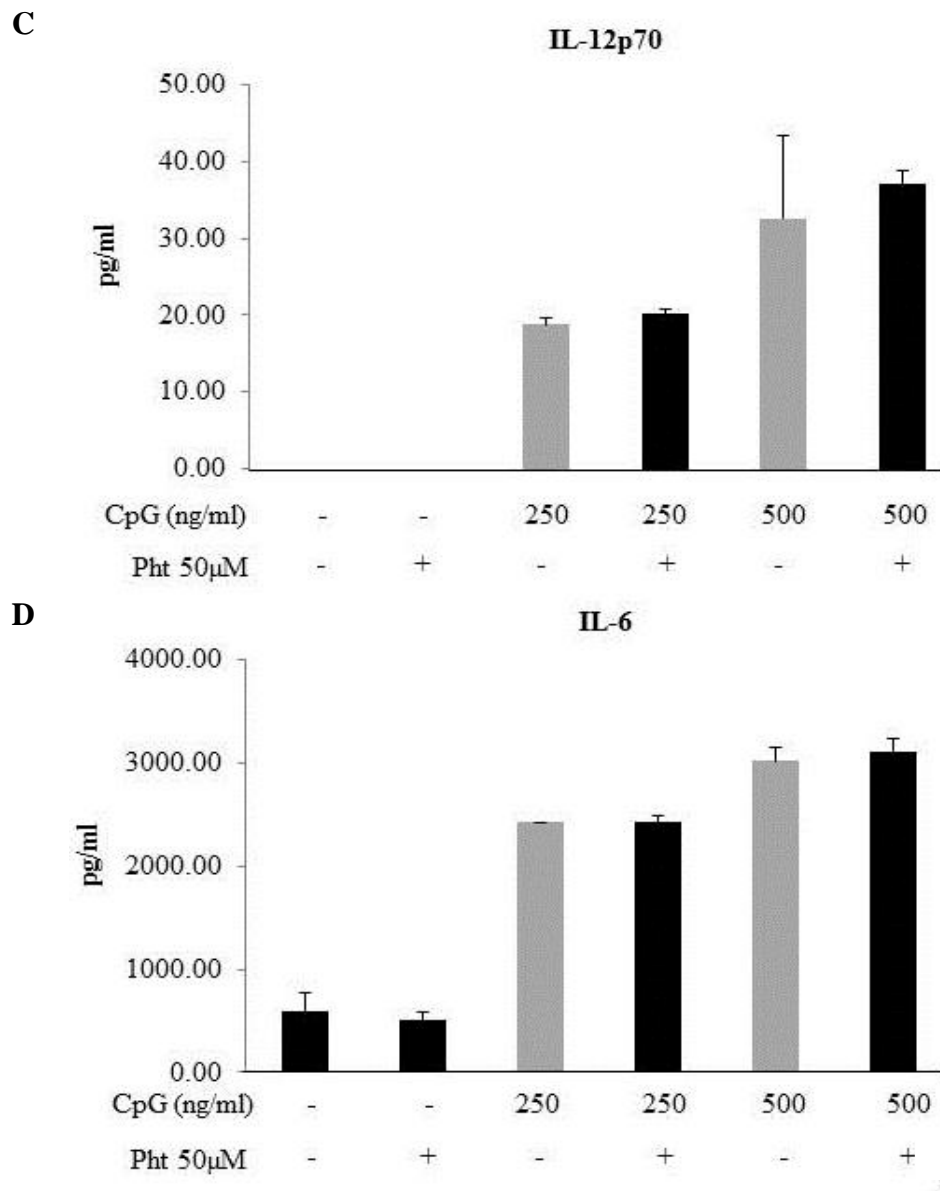
ภาพที่ 9 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุล (co-stimulatory molecule) และโมเลกุล MHC บนผิวของเดนไดรติกเซลล์

กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูก ด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังภาพ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์นำย้อมและตรวจวัดการแสดงออกของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุลบนผิวเซลล์ ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี (Flow cytometry) ดังแสดงในภาพ (A) CD80, (B) CD86, (C) MHCII ; แกน Y แสดง Mean fluorescence intensity ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ และ LPS คือแมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยลิโปลิแซ็กคาไรด์ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก; จำนวนตัวอย่าง n=2

4.1.4 ผลของพะไรโอคอลลร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ต่อการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์

เนื่องจากเดนไดรติกเซลล์เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจนให้กับทีเซลล์ ซึ่งจะมีตัวรับสัญญาณหลักคือกลุ่ม TLR (Toll-like receptor) ซึ่งในการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสารพะไรโอคอลลไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ได้ ผู้วิจัยจึงคาดการณ์ว่าการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ของสารพะไรโอคอลลอาจจำเป็นต้องมีลิแกนด์อื่นร่วมด้วย โดยในการศึกษาครั้งนี้สนใจ TLR-4 และ TLR-9 เนื่องจาก TLR-4 และ TLR-9 มีความสำคัญเมื่อมีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งการทดลองนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารพะไรโอคอลลร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ต่อการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์โดยกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (ลิแกนด์ของ TLR-4) หรือ CpG (ลิแกนด์ของ TLR-9) ความเข้มข้นที่แตกต่างกันร่วมกับมีสารพะไรโอคอลล 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ [6] และปราศจากสารพะไรโอคอลลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บ Supernatant เพื่อนำมาศึกษาไซโตไคน์ต่างๆ ด้วยวิธี ELISA โดยกระตุ้นสารพะไรโอคอลลร่วมกับ LPS พบว่ามีพบการผลิต IL-12p70 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกระตุ้นสารพะไรโอคอลลร่วมกับ LPS 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับ LPS 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ไม่มีสารพะไรโอคอลล (ภาพที่ 9A) แต่ไม่ผลความแตกต่างในการผลิต IL-6 (ภาพที่ 9B) ในทางตรงกันข้ามเมื่อกระตุ้นสารพะไรโอคอลลร่วมกับ CpG พบว่าไม่พบความแตกต่างของการผลิต IL-12p70 (ภาพที่ 9C) และการผลิต IL-6 (ภาพที่ 9D) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารพะไรโอคอลลร่วมกับ TLR4 ยับยั้งการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์

A**B**



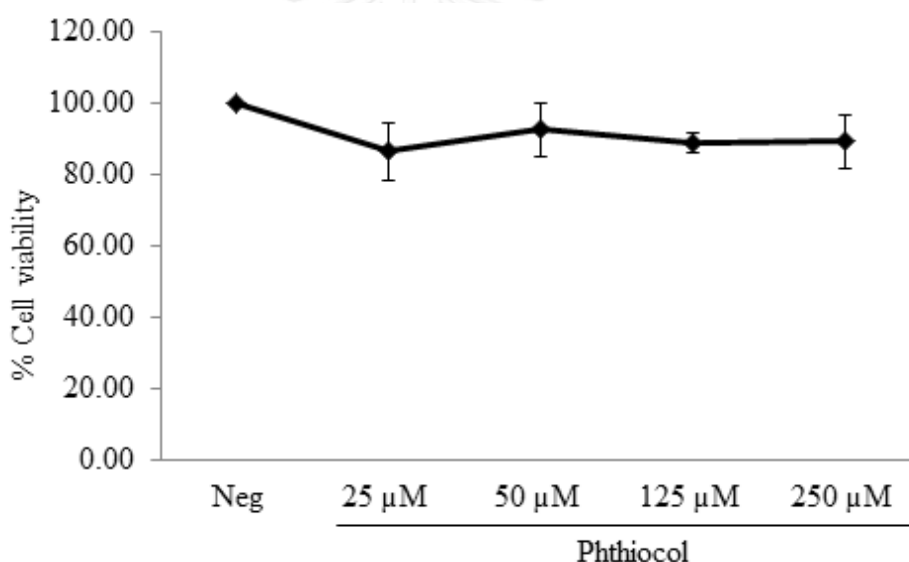
ภาพที่ 10 ผลของพะไรโอคอลลร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์

กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลลความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับลิแกนด์ของ TLR4 (A,B) และร่วมกับลิแกนด์ของ TLR9 (C,D) เก็บ supernatant นำมาตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ IL12p70 และ IL6 ด้วยเทคนิค ELISA; แกน Y แสดงปริมาณไซโตไคน์ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร); จำนวนตัวอย่าง n=3; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2 ผลของพะไรโอคอลต่อแมโครฟาจปฐมภูมิที่พัฒนาจากไขกระดูกของหนูเม้าส์

4.2.1 ความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อแมโครฟาจ

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าพะไรโอคอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ [4] ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของพะไรโอคอลต่อแมโครฟาจ โดยกระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25, 50, 125 และ 250 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาตรวจวัดความมีชีวิตด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่าพะไรโอคอลทุกความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อแมโครฟาจ ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบที่ได้รับ DMSO แล้วพบว่าความมีชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วงร้อยละ 90 ถึง 100 (ภาพที่ 10)

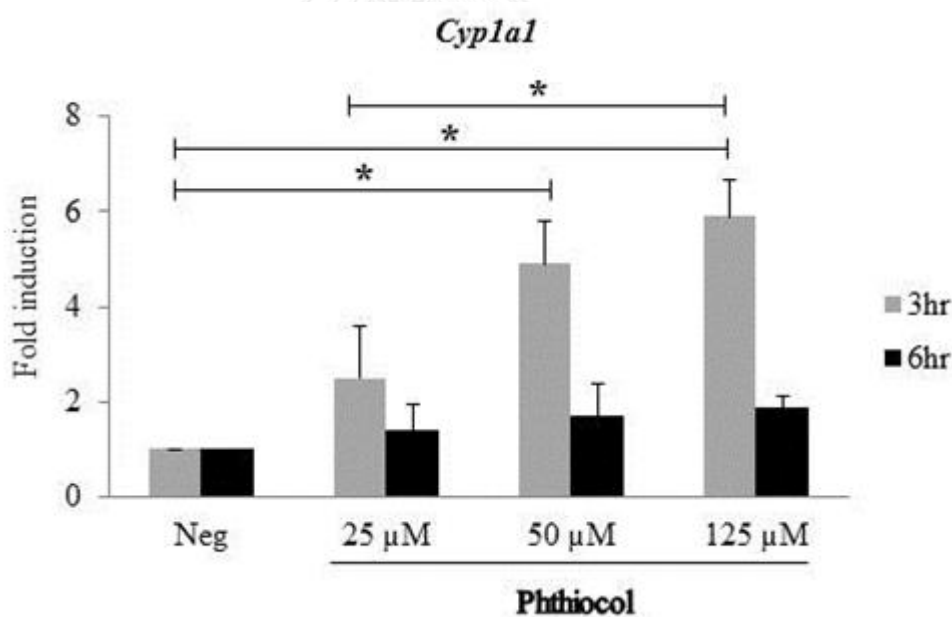


ภาพที่ 11 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แมโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพะไรโอคอลในปริมาณต่าง ๆ

กระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปวัดความมีชีวิตด้วย MTT คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ; Neg คือกลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n=3

4.2.2 ผลของพะไรโอคอลต่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายของ AhR Cyp1a1

เพื่อยืนยันว่าพะไรโอคอลสามารถเข้าสู่แมโครฟาจ และจับกับตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงกระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นด้วยสารพะไรโอคอล จากผลการทดลองพบว่า ณ เวลา 6 ชั่วโมง สารพะไรโอคอลสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* เพิ่มขึ้นแบบแปรตามความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้น 50, 125 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (ภาพที่ 11) และสารพะไรโอคอลในความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แสดงว่าพะไรโอคอลความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในแมโครฟาจได้โดยตรง

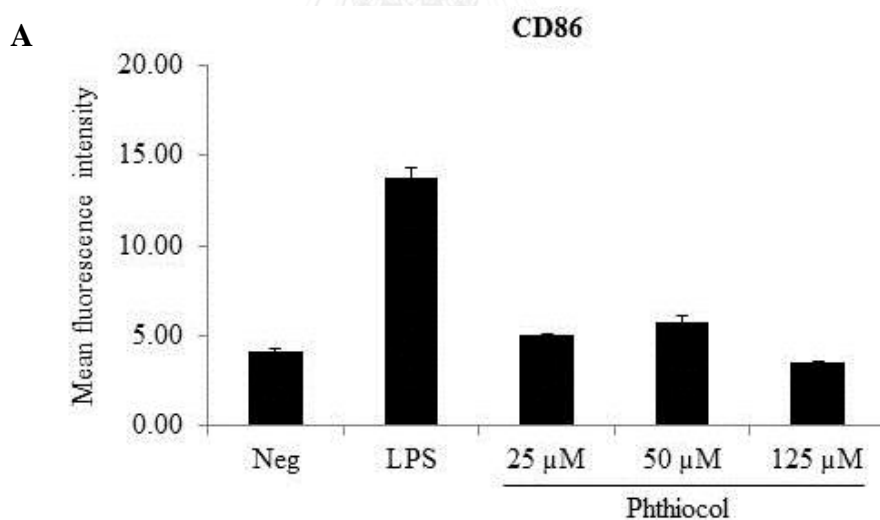


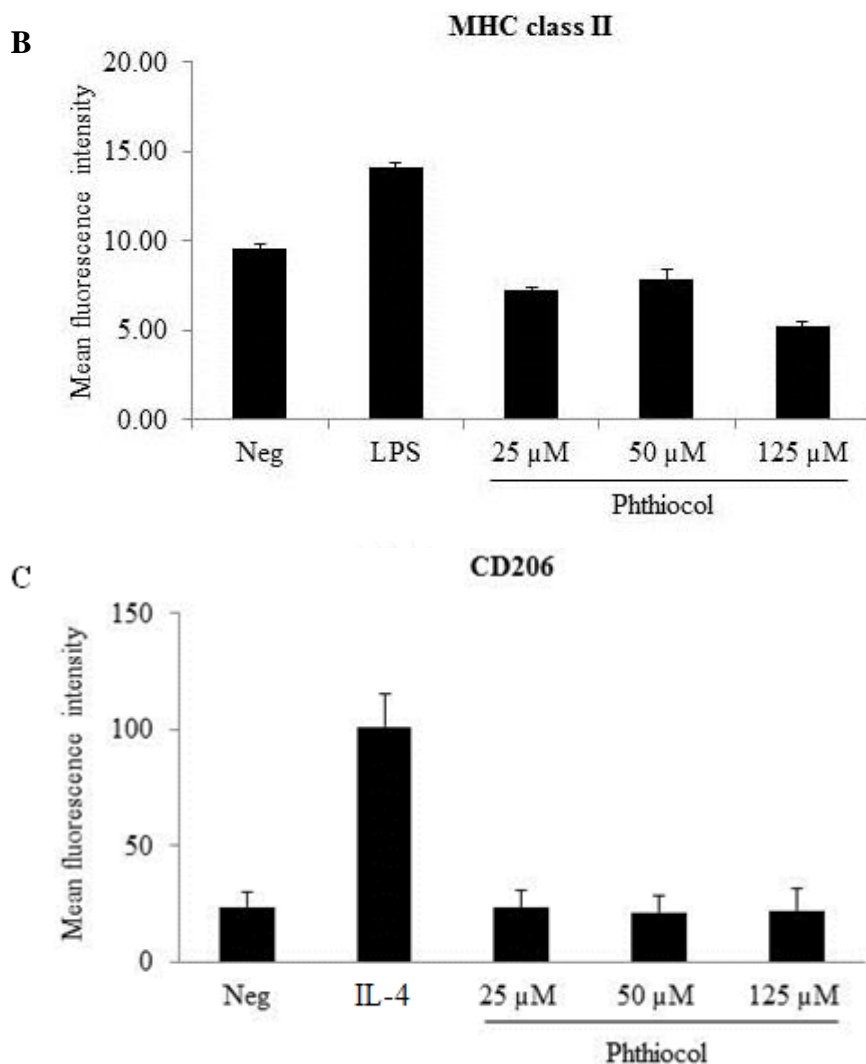
ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ในแมโครฟาจ

กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 3 หรือ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR; แกน Y แสดง fold induction โดยคำนวณ relative mRNA expression ของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนควบคุม (*Gapdh*) ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n=3; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2.3 ผลของพะไรโอคอลลต่อการแสดงออกของโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ (Surface marker) ในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ

การเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจมีผลต่อการกำจัด *M. tuberculosis* [40, 41] ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบว่าพะไรโอคอลลมีผลทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ (Surface marker) ในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจชนิด M1 หรือ M2 โดยกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลลที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์ตามลำดับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนบนผิวบนผิวเซลล์ ด้วยเทคนิคฟลูออโรไซโตเมทรี ซึ่ง CD86, MHC CLASS II เป็นโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ในแมโครฟาจชนิด M1 และ CD206 เป็นโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ในแมโครฟาจชนิด M2 จากผลการทดลองพบว่าพะไรโอคอลลไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ทั้งชนิด M1 (ภาพที่ 12A,B) และ M2 (ภาพที่ 12C) ในแมโครฟาจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพะไรโอคอลลอาจไม่สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจได้



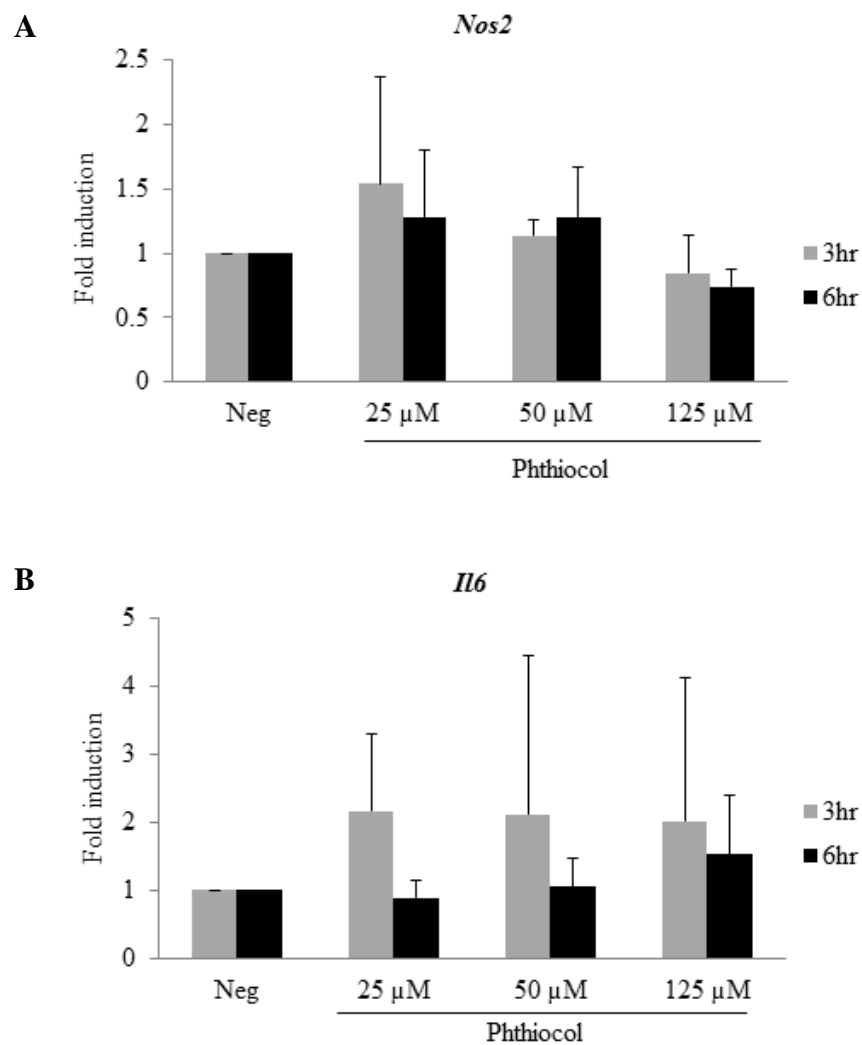


ภาพที่ 13 ผลของพะไรโอคอลลต่อการแสดงออกของ costimulatory molecule บนผิวของแมโครฟาจ กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้นที่ต่างกัน ดังภาพ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์นำย้อมและตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนบนผิวบนผิวเซลล์ ด้วยเทคนิค Flow Cytometry โดยโปรตีนบนผิวที่ใช้บ่งชี้การเปลี่ยนสภาพเป็น M1 ดังแสดงในภาพ (A) CD86, (B) MHC CLASS II และโปรตีนบนผิวที่ใช้บ่งชี้การเปลี่ยนสภาพเป็น M2 แสดงในภาพ (C) CD206 ; แกน Y แสดง Mean fluorescence intensity ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ, LPS คือแมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ภาพที่ 12A,B) และ IL-4 คือ แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-4 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ภาพที่ 12C); จำนวนตัวอย่าง n=3

4.2.4 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกระดับยีนในกลุ่ม M1,M2 ของแมโครฟาจ

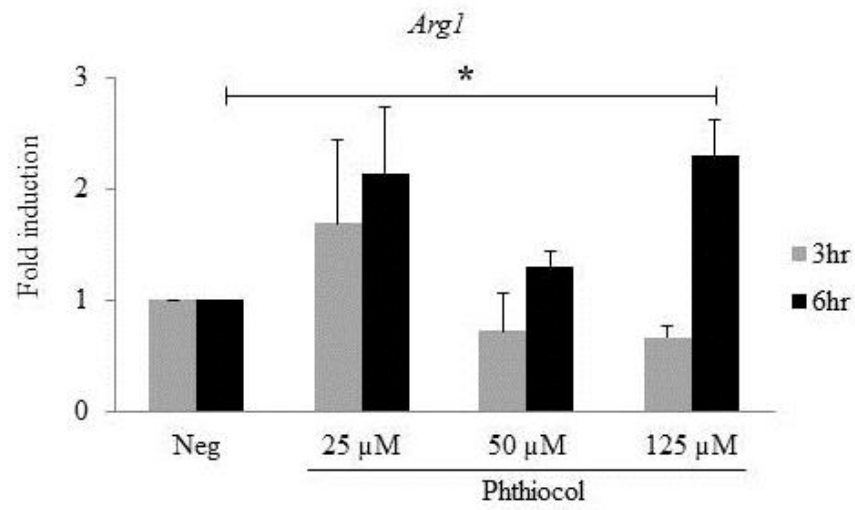
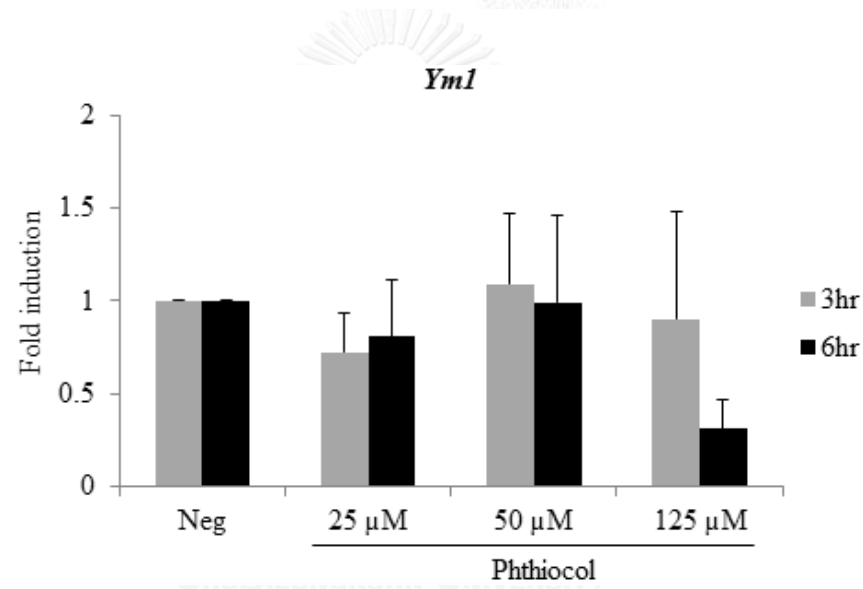
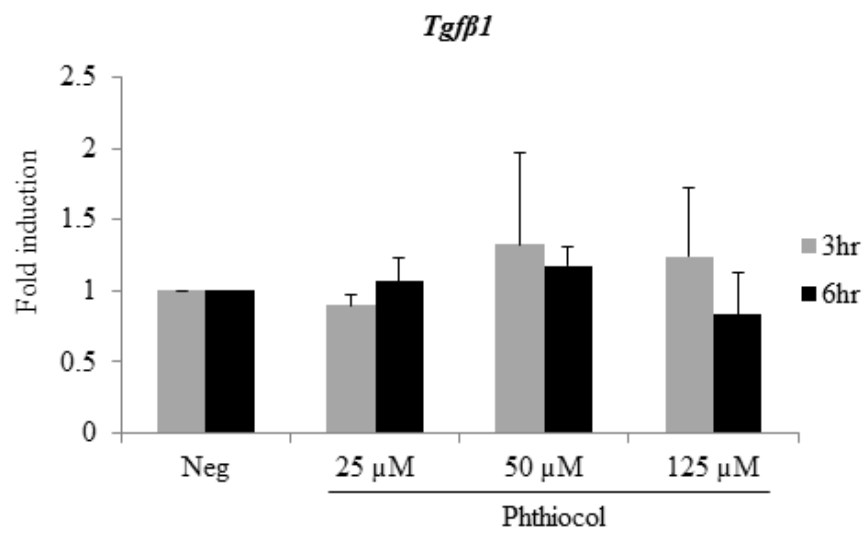
จากการศึกษาโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ ไม่พบความแตกต่างของโมเลกุลเฉพาะบนผิวเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมในระดับยีนโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบว่าพะไรโอคอลมีผลทำให้มีการแสดงออกระดับยีนของแมโครฟาจเปลี่ยนสภาพเป็น M1 หรือ M2 โดยกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์ และตรวจสอบการเปลี่ยนสภาพเป็น M1 โดยวัดการแสดงออกของยีน *Nos2* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัส inducible nitric oxide synthase (iNos) และ *Il6* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสไซโตไคน์ interleukin-6 (IL-6) [42, 43] และตรวจสอบการเปลี่ยนสภาพเป็น M2 โดยวัดการแสดงออกของยีน *Arg1* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสเอ็นไซม์ arginase 1 ยีน *Ym1* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสโปรตีน YM1 ยีน *Il10* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสไซโตไคน์ interleukin-10 (IL-10) และ ยีน *Tgfb1* ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสไซโตไคน์ tumor necrosis factor-beta (TGF- β) [42, 43]

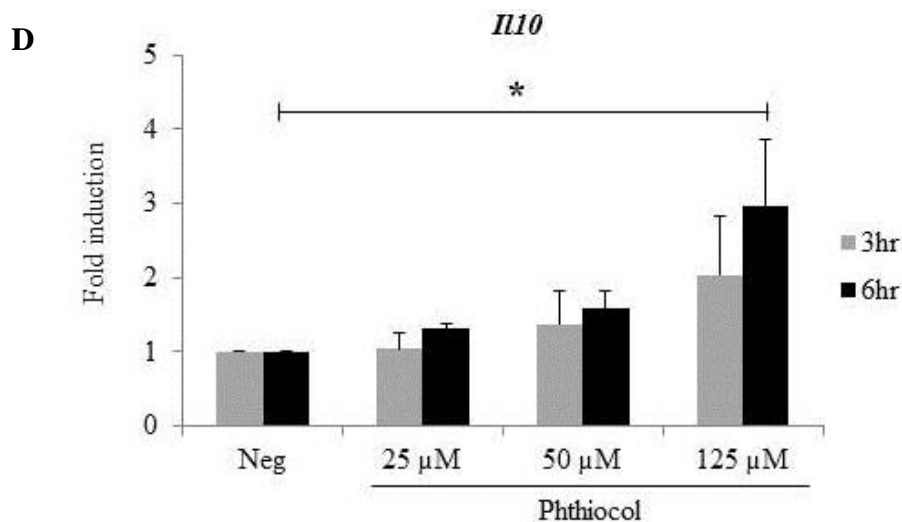
จากผลการทดลองพบว่าพะไรโอคอลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *Nos2*, *Il6*, ในแมโครฟาจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบทั้งที่ 3 และ 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 13) และพบว่าพะไรโอคอลจะไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *Ym1* และ *Tgfb* ทั้งที่ 3 และ 6 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่ 6 ชั่วโมงเมื่อกระตุ้นด้วยพะไรโอคอลความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของยีน *Arg1* และ *Il10* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในแมโครฟาจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (ภาพที่ 14) จากผลดังกล่าวแสดงว่าพะไรโอคอลสามารถกระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกให้เปลี่ยนสภาพให้มีฟีโนไทป์คล้าย M2



ภาพที่ 14 ผลของพะไฮโอคอลลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของยีนในแมโครฟาจเป็น M1

กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไฮโอคอลลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังกล่าว เป็นเวลา 3 หรือ 6 ชั่วโมง ตรวจสอบวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยยีนที่ใช้บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพเป็น M1 ได้แก่ *Nos2* (A) และ *Il6* (B); แกน Y แสดง fold induction โดยคำนวณ relative mRNA expression ของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนควบคุม (*Gapdh*) ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n=3;

A**B****C**

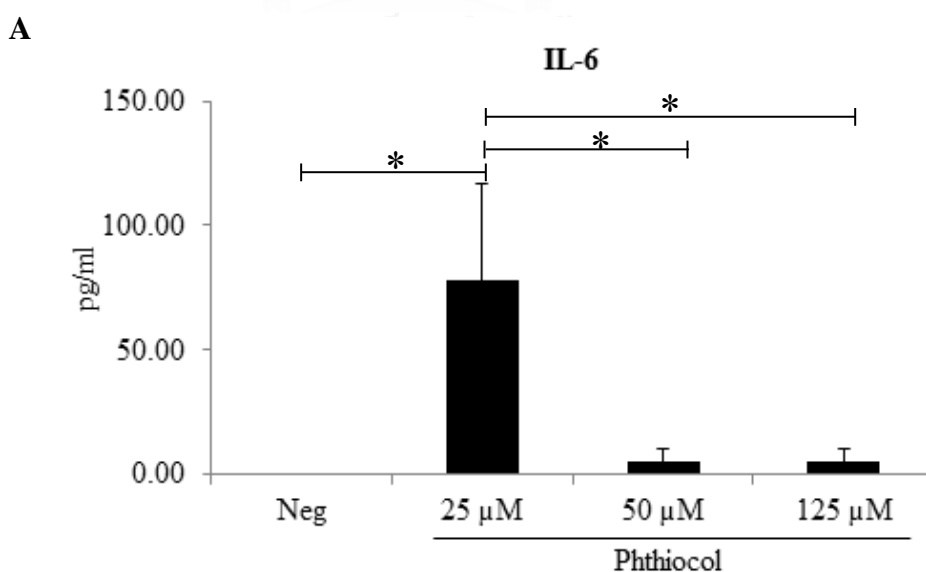


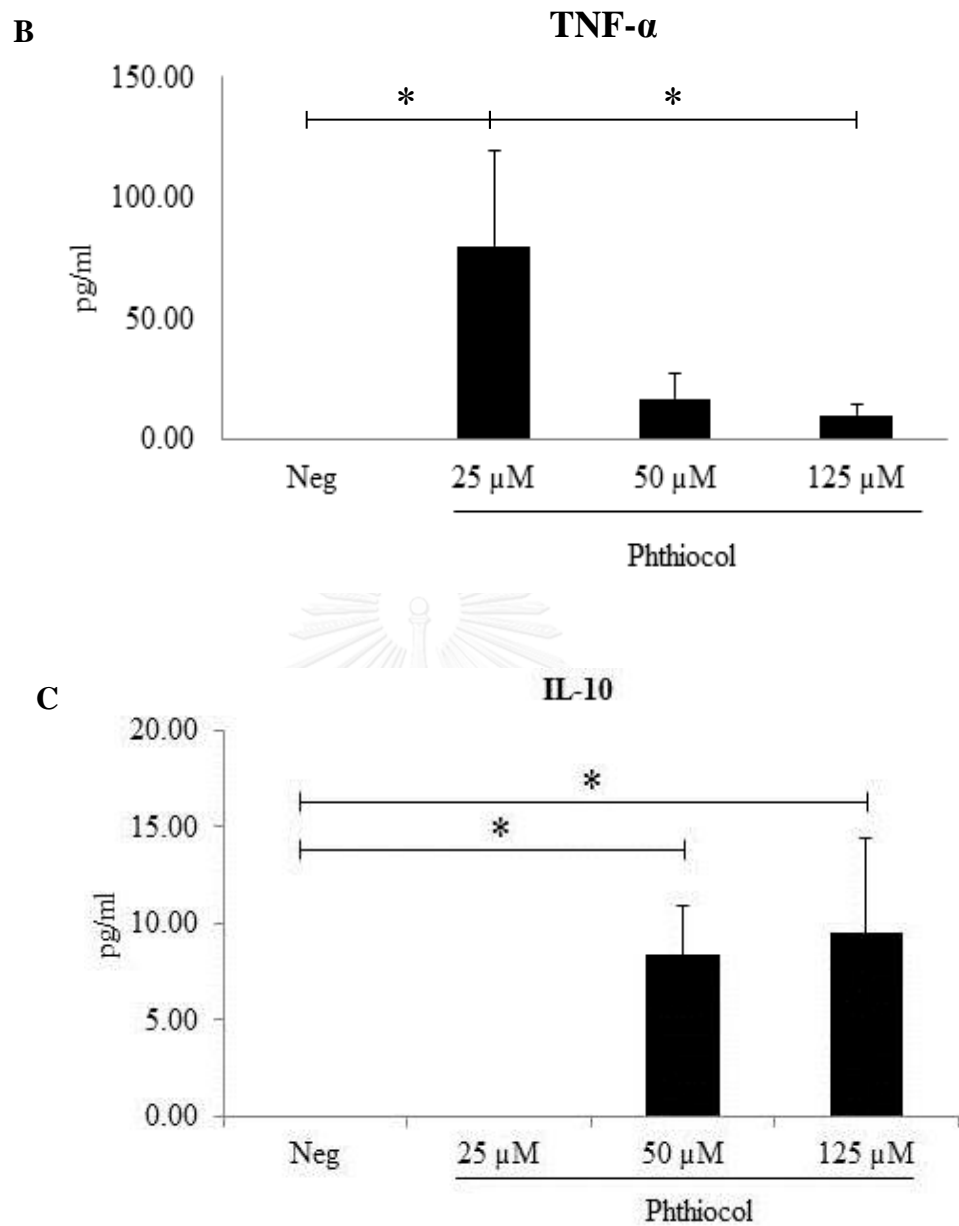
ภาพที่ 15 ผลของพะไรโอคอลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของของยีนแมโครฟาจเป็น M2

กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลในความเข้มข้นที่ต่างกักันดังภาพ เป็นเวลา 3 หรือ 6 ชั่วโมง ตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยยีนที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพเป็น M2 ได้แก่ *Arg1* (A), *Ym1* (B), *Tgfb1* (C) และ *Il10* (D); แกน Y แสดง fold induction โดยคำนวณ relative mRNA expression ของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนควบคุม (*Gapdh*) ; Neg คือ กลุ่มควบคุมเชิงลบ; จำนวนตัวอย่าง n=3; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2.5 ผลของพะไรโอคอลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจ

เพื่อยืนยันว่าพะไรโอคอลมีผลทำให้แมโครฟาจเปลี่ยนสภาพเป็น M1 หรือ M2 โดยกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 125 ไมโครโมลาร์ และตรวจสอบการเปลี่ยนสภาพเป็น M1 โดยวัดการหลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) คือ interleukin-6 (IL-6) และ TNF- α และการเปลี่ยนสภาพเป็น M2 โดยวัดการหลั่งไซโตไคน์ที่ยับยั้งการอักเสบคือ interleukin-10 (IL-10) ผลการทดลองพบว่าปริมาณไซโตไคน์ IL-6 และ TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ในทางตรงกันข้ามพบว่าเมื่อกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอล 50 และ 125 ไมโครโมลาร์พบว่าปริมาณไซโตไคน์ IL-6 และ TNF- α ลดลงแบบแปรผันตามความเข้มข้น (ภาพที่ 15A, B) และเมื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์ที่ยับยั้งการอักเสบ พบปริมาณไซโตไคน์ IL-10 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลที่ 50 และ 125 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 15C) จากผลดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนของการผลิตไซโตไคน์ที่ยับยั้งการอักเสบ จึงสามารถสรุปได้ว่าพะไรโอคอลสามารถกระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกให้เปลี่ยนสภาพให้มีฟีโนไทป์คล้าย M2



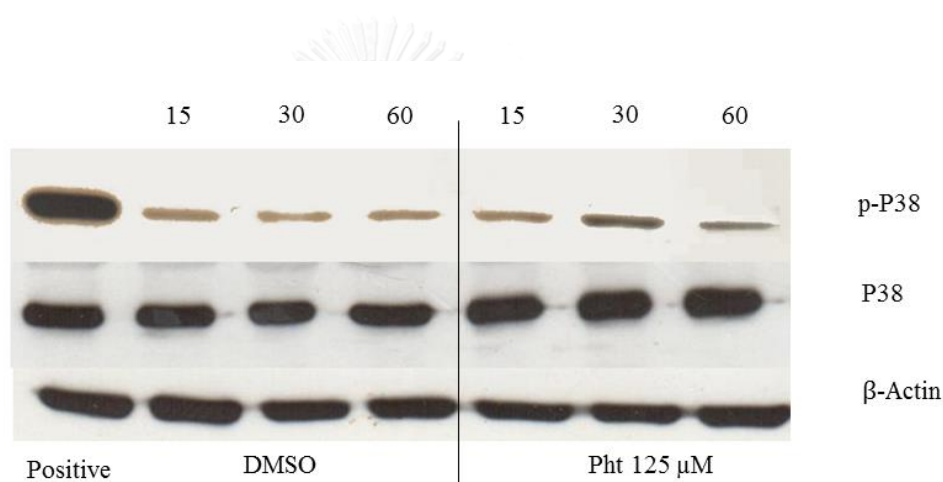


ภาพที่ 16 ผลของพะไรโอคอลลต่อการหลั่งไซโตไคน์ของแมโครฟาจ

กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บ supernatant นำมาตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่บ่งชี้การเปลี่ยนสภาพเป็น M1 ดังแสดงในภาพ (A) IL-6, (B) TNF- α และไซโตไคน์บ่งชี้การเปลี่ยนสภาพเป็น M2 ดังแสดงในภาพ (C) IL-10 ด้วยเทคนิค ELISA ; แกน Y แสดงปริมาณไซโตไคน์ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร); จำนวนตัวอย่าง n=3; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2.6. ผลของพะไรโอคอลลต่อการผลิตไซโตไคน์ IL-10 ของแมโครฟาจผ่านวิถีสัญญาณ p38

เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นพบว่าการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-10 เพิ่มขึ้น การทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิถีสัญญาณของการผลิตไซโตไคน์ IL-10 ในแมโครฟาจ โดยกระตุ้นแมโครฟาจด้วยพะไรโอคอลลที่ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่มีการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-10 มากที่สุด (ภาพที่ 15) และตรวจสอบ phosphor และ Total form ของ p38 ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองพบว่าที่ 30 และ 60 นาทีหลังจากกระตุ้นด้วย สารพะไรโอคอลล พบว่าการเพิ่มสูงขึ้น phosphorylated form ของ p38 (ภาพที่ 16) ซึ่งแสดงว่า สารพะไรโอคอลล กระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-10 ผ่านวิถีสัญญาณ p38



ภาพที่ 17 ผลของพะไรโอคอลลต่อวิถีสัญญาณ p38 ในแมโครฟาจ

กระตุ้นแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกด้วยพะไรโอคอลลความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 15,30 และ 60 นาที เก็บโปรตีนภายในเซลล์นำมาวิเคราะห์ p-p38 และ โปรตีน p38 ทั้งหมด ด้วยวิธี Western blot ; Positive คือแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก ที่กระตุ้นด้วย LPS 500 ng/ml นาน 30 นาที ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

เดนไดรติกเซลล์และแมโครฟาจเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดที่สามารถนำเสนอแอนติเจนและมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายและเป็นตัวกลางสำคัญในการกำจัดแบคทีเรียผ่านคุณสมบัติของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) [35] ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า สารพะไรโอคอลลีแนนท์ที่สามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนในเดนไดรติกเซลล์ได้ (ภาพที่ 6) แต่อาจจะไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ (DC maturation) (ภาพที่ 7) ซึ่งให้ผลไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาในเดนไดรติกเซลล์ที่เจริญเต็มที่โดยการกระตุ้นด้วยลิแกนด์อื่น ๆ ของตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอน [44] และนอกจากนี้มียางานเพิ่มเติมว่า ตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนสามารถ ทำหน้าที่เป็น PRR เช่นเดียวกับกลุ่มโทไลรีเซปเตอร์ [6] จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาผลของสารพะไรโอคอลลีแนนท์ร่วมกับลิแกนด์ของ TLR ซึ่งมีรายงานว่า TLR ที่มีความสำคัญต่อการติดเชื้อ *M. tuberculosis* คือ TLR-2, TLR-4 และ TLR-9 [45] ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกลิแกนด์ของ TLR-4 คือ lipopolysaccharide (LPS) และ TLR-9 คือ CpG-DNA เพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้แทนการใช้ protein ที่ได้จาก *M. tuberculosis* และเมื่อกระตุ้นสารพะไรโอคอลลีแนนท์ร่วมกับ TLR-4 พบว่าการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-12p70 ลดลง (ภาพที่ 9A) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาการกระตุ้น TCDD ร่วมกับ TLR-4 ในเดนไดรติกเซลล์ระยะ steady state [46] ทั้งนี้ผลการศึกษาบทบาทของสารพะไรโอคอลลีแนนท์ต่อการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ิลไฮโดรคาร์บอนในเดนไดรติกเซลล์และการกระตุ้นการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ยังไม่สามารถสรุปได้ อันเนื่องมาจากการศึกษาในครั้งนี้พบปัญหาจากหนูเมาส์ที่นำมาเตรียมเดนไดรติกเซลล์ ซึ่งเมื่อนำเซลล์ไขกระดูกนำมาเตรียมเดนไดรติกเซลล์พบว่ามี การตอบสนองของเซลล์ที่ต่ำลง โดยจะสังเกตผลการทดลองการแสดงผลของโค-สติมูลาโทรีโมเลกุล (co-stimulatory molecule) และโมเลกุล MHC ที่แสดงถึงการเจริญเต็มที่ของเดนไดรติกเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่ามี การแสดงผลที่ต่ำกว่าปกติ ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวจึงยังไม่สามารถสรุปได้ ซึ่งควรทำการทดลองซ้ำ เพื่อให้แน่ชัดว่าผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยพะไรโอคอลลีแนนท์จริง ไม่ได้เกิดจาก

ปัญหาจากเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองและควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับยีนและระดับโปรตีนหรือศึกษาผลของสารพะไรโอคอลในเดนไดรติกเซลล์ที่เจริญเต็มที่ เป็นต้น

ในการศึกษาผลของสารพะไรโอคอลในแมโครฟาจ พบว่าพะไรโอคอลสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในแมโครฟาจที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกได้ โดยการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *Cyp1a1* เพิ่มขึ้นตามปริมาณของพะไรโอคอลที่สูงขึ้น (ภาพที่ 11) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา [6]

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาแน่ชัดที่แสดงถึงบทบาทของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของแมโครฟาจ แต่มีรายงานว่าตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในแมโครฟาจที่แยกได้จากช่องท้องของหนูเม้าส์ (peritoneal macrophage) ทำหน้าที่ในการควบคุมและยับยั้งวิถีสัญญาณ TLR-4 จากการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) [25, 28] และนอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าสาร 3-methylcholanthrene ซึ่งเป็นลิแกนด์หนึ่งของตัวรับสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนสามารถยับยั้งสัญญาณการกระตุ้นของ (LPS) ได้ [28] จากหลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิถีสัญญาณอาริลไฮโดรคาร์บอนในแมโครฟาจน่าจะมีผลต่อการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของแมโครฟาจไปเป็น M1 และอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเป็น M2 ได้

งานวิจัยนี้มีศึกษาโมเลกุลที่เฉพาะบนผิวเซลล์ของแมโครฟาจชนิด M1 และ M2 แต่ไม่พบความแตกต่างของโมเลกุลที่เฉพาะบนผิวเซลล์ (ภาพที่ 12) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสารพะไรโอคอล มีความสามารถในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพของแมโครฟาจในระดับต่ำหรืออาจจำเป็นต้องศึกษาโมเลกุลที่เฉพาะบนผิวเซลล์ของแมโครฟาจชนิด M2 เพิ่มเติมเช่น CD163 เป็นต้น และเมื่อศึกษาในระดับการแสดงออกของยีนพบว่าสารพะไรโอคอลไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเป็น M1 (ภาพที่ 13) อย่างไรก็ตามพบว่าสารพะไรโอคอลความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์สามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 และ TNF- α (ภาพที่ 15A, B) ในขณะที่พะไรโอคอลความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ทั้งสองดังกล่าว แต่กลับกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-10 (ภาพที่ 15C) ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าผลตรงข้ามที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากปริมาณของพะไรโอคอลอาจเหนี่ยวนำการทำงานของวิถีสัญญาณของอาริลไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน ซึ่งต้องทำการพิสูจน์ต่อไปโดยศึกษา ยีนและโปรตีนเป้าหมายของทั้งวิถีสัญญาณ canonical และ non-canonical ของวิถี AhR [47]

โดยรวมการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนด้วยลิแกนด์ชนิดพะไรโอคอลล มีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแมโครฟาจไปเป็น M2 ได้ (ภาพที่ 14) จากผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนด้วยพะไรโอคอลลความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้การเปลี่ยนสภาพเป็น M2 แบบจำเพาะ โดยมีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเพียง 2 ชนิด ได้แก่ *IL10* และ *Arg1* ซึ่งจากการศึกษาในทีเซลล์พบว่าเมื่อยับยั้งวิถีสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนในทีเซลล์ มีผลทำให้ทีเซลล์หลั่ง IL-10 ลดลง [48] แสดงถึงบทบาทของอาร์ลไฮโดรคาร์บอนต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *IL10* ในเซลล์ภูมิคุ้มกัน และในงานวิจัยนี้ยังพบว่าสารพะไรโอคอลลสามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-10 ผ่านวิถีสัญญาณ p38 และเมื่อไม่นานมานี้มีการรายงานว่าคอมเพล็กซ์ของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนมีผลโดยตรงต่อการแสดงออกของยีน *IL10* [9] และยังไม่มีการศึกษาใดกล่าวถึงบทบาทของวิถีสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *Arg1* ซึ่งอาจต้องพิสูจน์โดยการศึกษาร่วมกันของคอมเพล็กซ์ของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนกับ promotor ของยีน *Arg1* และยืนยันการจับคอมเพล็กซ์ของตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนกับ promotor *IL10* ในอนาคตต่อไป

ผลการทดลองสรุปได้ว่าจากการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ด้วยสารพะไรโอคอลลพบว่าสารพะไรโอคอลลยังไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้ แต่พบแนวโน้มที่สามารถจับกับตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนภายในเดนไดรติกเซลล์ได้โดยตรง ซึ่งในแมโครฟาจพบว่าสารพะไรโอคอลลสามารถจับกับตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอนภายในแมโครฟาจได้และพะไรโอคอลลน่าจะมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนสภาพของแมโครฟาจเป็นชนิด M2 โดยผ่านทางตัวรับสัญญาณอาร์ลไฮโดรคาร์บอน ซึ่งการเปลี่ยนสภาพดังกล่าวส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมวัณโรคได้ ดังนั้นพะไรโอคอลลในผนังเซลล์ของ *M. tuberculosis* จึงอาจเป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่เชื้อใช้ในการรุกรานระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

รายการอ้างอิง

1. Forrellad, M.A., et al., *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex*. *Virulence*, 2013. 4(1): p. 3-66.
2. Anderson, R.J. and M.S. Newman, *The chemistry of the lipids of tubercle bacilli*. *J. Biol. Chem*, 1933. 103: p. 405-412.
3. Fethke, N. and R.J. Anderson, *Chemistry of the lipids of tubercle bacilli; a contribution to the study of acid-fastness of acid-fast bacilli*. *Am Rev Tuberc*, 1948. 57(3): p. 294-305.
4. Gardner, P.R., *Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. 333(1): p. 267-274.
5. Esser, C. and A. Rannug, *The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology*. *Pharmacol Rev*, 2015. 67(2): p. 259-279.
6. Moura-Alves, P., et al., *AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence*. *Nature*, 2014. 512(7515): p. 387-392.
7. Stockinger, B., et al., *External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor*. *Semin Immunol*, 2011. 23(2): p. 99-105.
8. Ward, J.M., et al., *Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with Helicobacter hepaticus*. *Lab Anim Sci*, 1996. 46(1): p. 15-20.
9. Memari, B., et al., *Engagement of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages Has Pleiotropic Effects on Innate Immune Signaling*. *J Immunol*, 2015. 195(9): p. 4479-91.
10. Dias, M.F., et al., *Update on cutaneous tuberculosis*. *An Bras Dermatol*, 2014. 89(6): p. 925-938.

11. Jo, E.K., *Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs*. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. 21(3): p. 279-286.
12. Stamm, C.E., A.C. Collins, and M.U. Shiloh, *Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus*. *Immunol Rev*, 2015. 264(1): p. 204-219.
13. Shaler, C.R., et al., *Pulmonary mycobacterial granuloma increased IL-10 production contributes to establishing a symbiotic host-microbe microenvironment*. *Am J Pathol*, 2011. 178(4): p. 1622-1634.
14. Bozzano, F., F. Marras, and A. De Maria, *Immunology of tuberculosis*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2014. 6(1): p. e2014027.
15. Zhang, Q. and I. Sugawara, *Immunology of tuberculosis*. *World J Exp Med*, 2012. 2(4): p. 70-74.
16. Walzl, G., et al., *Immunological biomarkers of tuberculosis*. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(5): p. 343-354.
17. Ehlers, S. and U.E. Schaible, *The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion*. *Front Immunol*, 2012. 3: p. 411.
18. Lugo-Villarino, G., et al., *Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas*. *Front Immunol*, 2012. 3: p. 405.
19. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43: p. 309-34.
20. Sibilano, R., C.E. Pucillo, and G. Gri, *Allergic responses and aryl hydrocarbon receptor novel pathway of mast cell activation*. *Mol Immunol*, 2015. 63(1): p. 69-73.
21. Hanieh, H., *Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends*. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 520763.

22. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor*. Chem Res Toxicol, 2008. 21(1): p. 102-116.
23. Cella, M. and M. Colonna, *Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity*. Semin Immunol, 2015. 27(5): p. 310-314.
24. Levine-Fridman, A., L. Chen, and C.J. Elferink, *Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity*. Mol Pharmacol, 2004. 65(2): p. 461-469.
25. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses*. J Exp Med, 2009. 206(9): p. 2027-2035.
26. Hundeiker, C., et al., *Thymocyte development in Ah-receptor-deficient mice is refractory to TCDD-inducible changes*. Int J Immunopharmacol, 1999. 21(12): p. 841-859.
27. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. Science, 1995. 268(5211): p. 722-726.
28. Sekine, H., et al., *Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock*. Mol Cell Biol, 2009. 29(24): p. 6391-6400.
29. Nguyen, N.T., et al., *Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(46): p. 19961-19966.
30. Vogel, C.F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 375(3): p. 331-335.
31. Wu, D., et al., *AhR deficiency impairs expression of LPS-induced inflammatory genes in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. 410(2): p. 358-363.

32. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(10): p. 762-774.
33. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. 11(10): p. 889-896.
34. Claria, J., et al., *New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators*. Front Immunol, 2011. 2: p. 49.
35. Nguyen, N.T., et al., *The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses*. Int Immunol, 2013. 25(6): p. 335-343.
36. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol, 2010. 11(10): p. 936-944.
37. Matsunawa, M., et al., *The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages*. Toxicol Sci, 2009. 109(1): p. 50-58.
38. Monteiro, P., et al., *AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 358(2): p. 442-448.
39. Palaga, T., et al., *Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions*. Eur J Immunol, 2008. 38(1): p. 174-83.
40. Lugo-Villarino, G., et al., *Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV*. Front Immunol, 2011. 2: p. 43.
41. Huang, Z., et al., *Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro*. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0129744.

42. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. *Immunity*, 2010. 32(5): p. 593-604.
43. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. *Trends Immunol*, 2002. 23(11): p. 549-555.
44. Hana'a A. Abu-Rezq1, Douglas G. Millar2, *Effects of aryl-hydrocarbon ligands on dendritic cell maturation*, in *SciencePG*. 2013. p. 24-34.
45. Kleinnijenhuis, J., et al., *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*, 2011. 2011: p. 405310.
46. Simones, T. and D.M. Shepherd, *Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells*. *Toxicol Sci*, 2011. 119(2): p. 293-307.
47. Jackson, D.P., A.D. Joshi, and C.J. Elferink, *Ah Receptor Pathway Intricacies; Signaling Through Diverse Protein Partners and DNA-Motifs*. *Toxicol Res (Camb)*, 2015. 4(5): p. 1143-1158.
48. Gagliani, N., et al., *Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation*. *Nature*, 2015. 523(7559): p. 221-225.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มีซีรัมความเข้มข้น (Fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI	100	มิลลิลิตร
ซีรัม (Inactivated Fetal bovine serum)	10	มิลลิลิตร
สารละลายกลูตาแมกซ์ (GlutaMAX; 100X)	1	มิลลิลิตร
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมความเข้มข้น (Fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์

อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM	90	มิลลิลิตร
ซีรัม (Inactivated Fetal bovine serum)	10	มิลลิลิตร
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1	มิลลิลิตร
โซเดียมไพรูเวท (Sodium pyruvate)	1	มิลลิลิตร
HEPES	1	มิลลิลิตร

3. ซีรัม inactivated Fetal bovine serum

ซีรัมจากลูกวัว (Fetal bovine serum) ที่เก็บใน -20 องศาเซลเซียส ต้องนำมาละลายที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืนและนำมาบ่มที่ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อ inactivated ซีรัม

4. น้ำปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase) (DEPC water) สำหรับงาน RNA

เติมสารละลาย Diethylpyrocarbonate ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยปริมาตรต่อปริมาตรลงในน้ำและกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็กตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

5. สารละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ในน้ำปราศจากอาร์เอ็นเอส

เอทานอล (absolute Ethanol)	7.5	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากอาร์เอ็นเอส	2.5	มิลลิลิตร

6. สารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สาร MTT		มิลลิกรัม
สารละลาย DPBS	10	มิลลิลิตร

ละลายสาร MTT ใน DPBS ให้เข้ากันและนำไปกรองปราศจากเชื้อ โดยใช้ชุดกรองสำเร็จรูปขนาดรู 0.22 ไมโครเมตรและแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย 1X Phosphate-Buffered Saline (1X PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันและเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้ HCl 1 นอร์มาลิตี หรือ NaOH 1 นอร์มาลิตี ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. สารละลาย Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (dPBS)

ผง DPBS	9.55	กรัม
น้ำกลั่น (DI water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผง DPBS ในน้ำกลั่นและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

9. สารละลาย FACs

1X PBS pH 7.4	100	มิลลิลิตร
ซีรัม (Inactivated Fetal bovine serum)	1	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.1	กรัม

10. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

bovine serum albumin (BSA)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันและแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 500 ไมโครลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. สารละลาย BCA protein assay

สารละลาย A	50	ส่วน
สารละลาย B	1	ส่วน

12. การเตรียม SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

12.1 การเตรียม 12% separating gel 8 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	3.436	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2	มิลลิลิตร
สารละลาย 40% Acrylamide/Bis	1.6	มิลลิลิตร
10% SDS	0.08	มิลลิลิตร
10% APS	0.08	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ผสมทุกอย่างให้เข้ากันและเติม TEMED เป็นลำดับสุดท้าย

12.2 การเตรียม 5% stacking gel 2 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	1.204	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	0.504	มิลลิลิตร
สารละลาย 40% Acrylamide/Bis	0.25	มิลลิลิตร
10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร
ผสมทุกอย่างให้เข้ากันและเติม TEMED เป็นลำดับสุดท้าย		

13. การเตรียม 2X Laemmli sample buffer (SDS-dry)

1 M Tris-HCl pH 6.8	1	มิลลิลิตร
10% SDS	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2.01	มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	2.989	มิลลิลิตร

14. การเตรียม 5X running buffer for SDS

Tris-base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

15. การเตรียม 1X PBST (Phosphate-Buffered Saline+Tween20)

1X PBS pH 7.4	1000	มิลลิลิตร
Tween 20	0.05	เปอร์เซ็นต์

16. การเตรียมสารละลาย 3% Blocking สำหรับ Western blot

1XPBST	50	มิลลิลิตร
Skim milk	3	กรัม

17. การเตรียม 2N H₂SO₄

18M Sulfuric Acid	5.56	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	94.44	มิลลิลิตร

18. การเตรียม Transfer buffer for Western blot

Tris-base	5.08	กรัม
Glycine	2.9	กรัม
SDS	0.37	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
เมทานอล (absolute methanol)	200	มิลลิลิตร

19. การเตรียม ECL substrate

19.1 Solution A ECL

100mM Tris-HCl pH 8.5	4	มิลลิลิตร
90mM coumaric acid	17.6	ไมโครลิตร
250mM lumunol	40	ไมโครลิตร

19.2 Solution 2 ECL

100mM Tris-HCl pH 8.5	4	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	17.6	ไมโครลิตร

20. การเตรียม RIPA buffer

1M Tris-HCl pH 7.4	0.35	มิลลิลิตร
0.5M NaCl	2.1	มิลลิลิตร
100% Nonidet P-40	0.07	มิลลิลิตร
10% Sodium Deoxycholate	0.35	มิลลิลิตร
20% SDS	0.035	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.095	มิลลิลิตร
7X Protease inhibitor (เตรียมก่อนใช้)	1	มิลลิลิตร



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายพรหมฉัตร เจริญพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรสหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556

