



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

ชื่อนิสิต

นางสาววิสุทธิยา เปลา เลขประจำตัว 5932352423

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

2562



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

(Combined inhibition of Histone deacetylase and Histone methyltransferase inhibitor in orbital fibroblast from Graves' ophthalmopathy patients)

ชื่อนิสิต

นางสาววิสุทธिया เปลา

เลขประจำตัว 5932352423

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

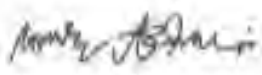
หัวข้อโครงการ ผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

โดย นางสาววิสุทธิดา เปลา เลขประจำตัวนิสิต 5932352423

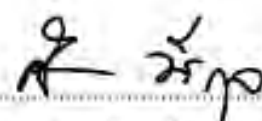
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล

ปีการศึกษา 2562


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์


.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย กัทธกุลณิมิต)

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล)


.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อานนท์ ปาลกะ)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ชยมกิต)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ
Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา
จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

(Combined inhibition of Histone deacetylase and Histone
methyltransferase inhibitor in orbital fibroblast from Graves'
ophthalmopathy patients)

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาววิสุทธिया เปลา

เลขประจำตัวนิสิต 5932352423

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 256

ชื่อโครงการ ผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

นิสิตหัวหน้าโครงการ นางสาววิสุทธิยา เปลา เลขประจำตัวนิสิต 5932352423

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

Graves' ophthalmopathy (GO) หรือโรคตาโปนจากไทรอยด์ เป็นโรคภูมิคุ้มกันต่อต้านเนื้อเยื่อตนเอง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการตาโปน เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคคือเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา การรักษาในปัจจุบันใช้ยา steroid และการผ่าตัดเป็นหลัก ซึ่งอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงและไม่จำเพาะต่อโรค โดยจากการศึกษาพบว่ากระบวนการ Epigenetics ชนิด Histone modification มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค GO ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้กระบวนการ Histone modification เป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษาโรค โดยศึกษาเอนไซม์ Histone deacetylase (HDAC) และเอนไซม์ Histone methyltransferase (HMT) จากผลการทดลองในงานวิจัยก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB จะมีระดับการแสดงออกของ mRNA ยีน HDAC ชนิด *HDAC4* และยีน HMT ชนิด Enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) และ Protein arginine methyltransferase 5 (*PRMT5*) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT ร่วมกัน ต่อการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast activity) ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสร้าง cytokine ชนิด IL-6 และ hyaluronan ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ถูกกระตุ้นโดย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่า มีแนวโน้มลดการแบ่งตัวของเซลล์ ($P = 0.0540$) แต่ไม่ลดการผลิต IL-6 ($P = 0.6768$) และ hyaluronan ($P = 0.9164$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ถูกกระตุ้นโดย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.1668$) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองทั้งหมดในการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT ร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าการลดระดับการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในดวงตาไม่แตกต่างกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod DZNeP หรือ GSK591 เพียงอย่างเดียว ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สารยับยั้งเหล่านี้ หรือการใช้การยับยั้ง HDAC และ HMT ชนิดอื่นร่วมกัน อาจนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาโรค GO ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

Project title Combined inhibition of Histone deacetylase and Histone methyltransferase inhibitor in orbital fibroblast from Graves' ophthalmopathy patients

Name of student Miss Wisuttiya Peala Student ID: 5932352423

Project Advisor Dr. Sita Virakul

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2019

Abstract

Graves' ophthalmopathy (GO) is an immune disease targeting self-tissue, which is the cause of proptosis. The cells that play an important role in the disease are orbital fibroblasts. Current treatments for this disease are steroid drugs and surgery, which may cause side effects and not specific. Previous studies showed that histone modification, an epigenetic process, plays an important role in GO. In this research, Histone deacetylase (HDAC) and Histone methyltransferase (HMT), important enzymes in histone modification are used as new targets for the GO treatment. Previous research showed that the expression level of *HDAC4*, Enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) and Protein arginine methyltransferase 5 (*PRMT5*) mRNA in orbital fibroblast increased significantly after stimulated with PDGF-BB ($P < 0.05$). This research focused on the effects of the combination of HDAC and HMT inhibitors on fibroblast activities including orbital fibroblast proliferation, production of IL-6 and hyaluronan in the orbital fibroblasts from GO patients. The results showed that the combination of Tasquinimod and DZNeP inhibitors showed no toxicity to orbital fibroblasts. When comparing the conditions of PDGF-BB with PDGF-BB in the presence of both inhibitors, there was a trend of reduction in cell proliferation ($P = 0.0540$) but not on IL-6 ($P = 0.6768$) and hyaluronan ($P = 0.9164$). When compared the conditions stimulated by PDGF-BB with PDGF-BB in the presence of Tasquinimod and GSK591 inhibitors showed no significant difference in IL-6 levels ($P = 0.1668$). However, all results showed that there is no difference in the reduction of fibroblast activities from the combination of HDAC and HMT inhibitors when comparing with use of Tasquinimod, DZNeP or GSK591. Further study using combination of these inhibitors or other HDAC and HMT inhibitors may lead to the novel effective treatment for GO.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของอาจารย์ ดร. ศีตา วีรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และยังเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในภาควิชา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ตลอดจนช่วยติชมปรับปรุงโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้รับจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1804/12 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สอนและให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ รวมถึงให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณนางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว และนายจิรายุส ขาวสังข์ เพื่อนนิสิตร่วมโครงการ ที่คอยสนับสนุน และให้ความช่วยเหลือกันเสมอ

ขอขอบคุณนายภูมินทร์ สีนธารา นางสาวเมษศิริินทร์ คนแรง นางสาวกุลนิษฐ์ จิรชวลา และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจกันตลอดมา

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และสมาชิกห้องปฏิบัติการ 2015 ที่ช่วยเหลือเพื่อสถานที่ในการทำปฏิบัติการงานวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้และตัวผู้วิจัยเอง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Kim Taeyeon, Kang Seulgi, An Yujin, Song Yuqi และนางสาวณิชา ยนตรรักษ์ สำหรับเสียงร้องเพลงที่เป็นกำลังใจให้ผู้วิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา ที่ให้กำลังใจและคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนถึงสิ้นสุดโครงการ

นางสาววิสุทธิดา เปลา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 โรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy)	1
1.2 เอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase	2
บทที่ 2 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์	
2.1 อุปกรณ์	7
2.2 เคมีภัณฑ์	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	9
บทที่ 4 ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	32
ภาคผนวก ข	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1: การทำงานของเอนไซม์ Histone methyltransferase ที่แตกต่างกันตามจำนวนหมู่เมทิล และตำแหน่งบนทางโปรตีนฮิสโตน	5
ตารางที่ 2.1: เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ ที่ใช้ในการทดลองและข้อมูลเบื้องต้นของแต่ละเซลล์	8
ตารางที่ 2.2: แสดงตำแหน่งของเอนไซม์ที่จำเพาะกับสารยับยั้ง และความเข้มข้น ที่ใช้ในการทดลอง	8
ตารางที่ 4.1: % Cytotoxicity เฉลี่ยของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	13
ตารางที่ 4.2: % Proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	15
ตารางที่ 4.3: ระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	18
ตารางที่ 4.4: ระดับ Hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	21
ตารางที่ 4.5: ระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ในแต่ละสภาวะ	24
ตารางที่ 6.1: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการทดลอง LDH assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	33
ตารางที่ 6.2: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	33

ตารางที่ 6.3: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH12 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	34
ตารางที่ 6.4: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	34
ตารางที่ 6.5: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการทดลองวัดระดับ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	35
ตารางที่ 6.6: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการทดลองวัดระดับ hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	35
ตารางที่ 6.7: ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการทดลองวัดระดับ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591	36

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1: กลไกการเกิด fibroblast activation ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา	2
รูปที่ 1.2: ตำแหน่งกรดอะมิโนบน Histone protein H3	3
รูปที่ 1.3: ชนิดของเอนไซม์ HDAC ที่แบ่งตาม Class	4
รูปที่ 1.4: ความเกี่ยวข้องของกับการทำงานของเอนไซม์ HDAC4 เมื่อกระตุ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB	5
รูปที่ 1.5: ความเกี่ยวข้องของกับการทำงานของเอนไซม์ EZH2 และ PRMT5 เมื่อกระตุ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB	6
รูปที่ 4.1: กราฟแสดง % Cytotoxicity เฉลี่ยของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP	13
รูปที่ 4.2: กราฟแสดง % Proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	16
รูปที่ 4.3: กราฟแสดงระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	19
รูปที่ 4.4: กราฟแสดงระดับ Hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ	22
รูปที่ 4.5: กราฟแสดงระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ในแต่ละสภาวะ	25

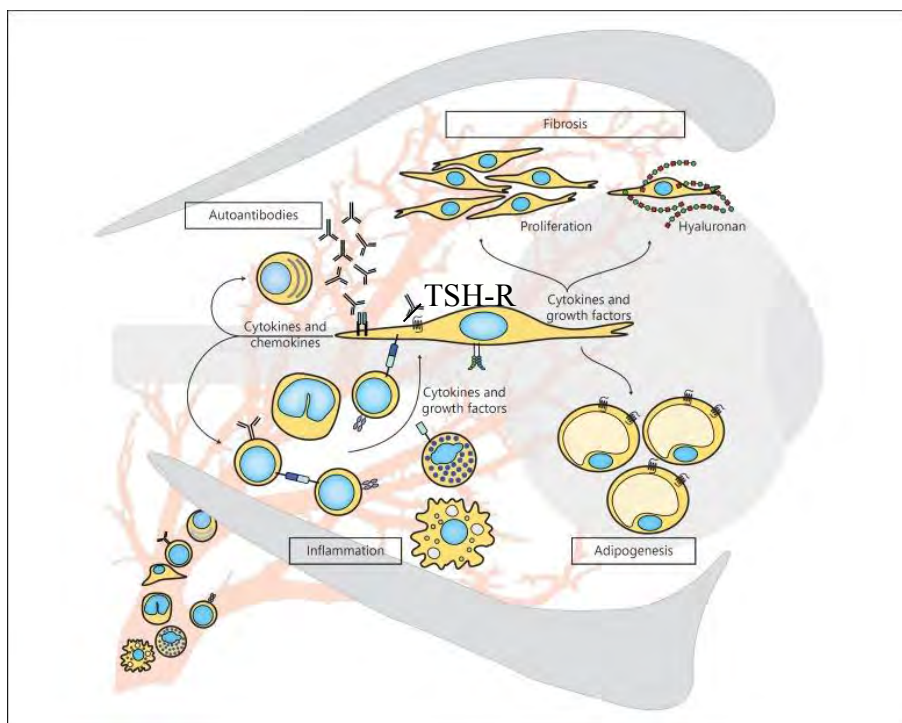
บทที่ 1 บทนำ

1.1 โรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy)

โรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' disease) เป็นโรคภูมิคุ้มกันทานเนื้อเยื่อตนเองของต่อมไทรอยด์ ในทุกปี จะพบผู้เกิดโรคใหม่ 20-50 คน ในประชากร 100,000 คน[1] โดยโรคคอพอกแบบเป็นพิษมีสาเหตุมาจากเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิด plasma cell สามารถผลิต antibody ต่อ Thyroid stimulating hormones receptor (TSH-R) ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณ (receptor) ของเซลล์ในต่อมไทรอยด์ได้ ส่งผลให้ต่อมไทรอยด์ถูกกระตุ้นให้ทำงาน มากเกินจนเกิดอาการผิดปกติ เช่น คอพอก ใจสั่น กระสับกระส่าย น้ำหนักลด เป็นต้น[1]

ความสามารถของ plasma cell ที่สามารถผลิต Anti-TSH-R antibody ได้ ยังส่งผลให้เกิดโรคตาโปน จากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy) เนื่องจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตามีการแสดงออก TSH-R เช่นเดียวกับเซลล์ในต่อมไทรอยด์ ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาถูกกระตุ้นให้ผลิตสารอักเสบ เช่น Cytokine ชนิด IL-6 และสาร extracellular matrix ชนิด Hyaluronan[2] ส่งผลให้เกิดอาการบวมแดง บริเวณเนื้อเยื่อรอบดวงตา เกิดพังผืด (Fibrosis) รวมทั้งส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเปลี่ยนสภาพไปเป็น เซลล์ไขมัน (Adipogenesis) ได้[2] (รูปที่ 1.1) นอกจากนี้ยังพบความสามารถของ growth factor ที่สำคัญอีก ชนิดหนึ่งในการทำให้เกิด fibrosis คือ Platelet-derived growth factor ชนิด BB (PDGF-BB) ซึ่งสามารถกระตุ้น ให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้[3]

การรักษาโรคตาโปนจากไทรอยด์ในปัจจุบันใช้ยา steroid และการผ่าตัดเป็นหลัก[4] อย่างไรก็ตามวิธีการ ดังกล่าวอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงและไม่จำเพาะต่อโรค ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้ Epigenetics เป็นเป้าหมาย ใหม่ในการรักษาโรค[5]



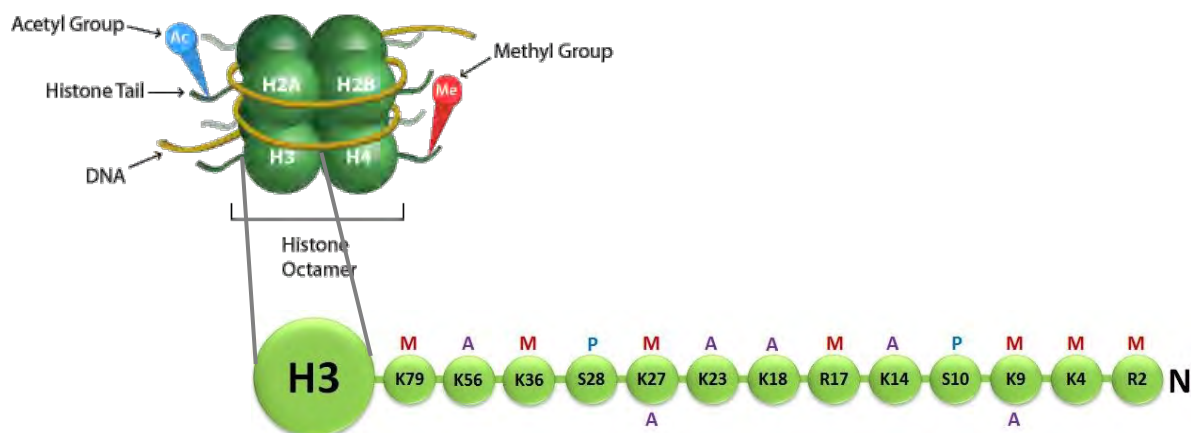
รูปที่ 1.1 : กลไกการเกิด fibroblast activation ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา[3]

1.2 เอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase

พันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนการแสดงออกของสารพันธุกรรมนอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ ผ่านกลไก DNA methylation กลไก Histone modification และ กลไก Non-coding RNA จากงานวิจัยก่อนหน้าทำให้ทราบว่ากระบวนการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเกิด Autoimmune Thyroid Disease (AITD)[5] เช่น การเกิด DNA methylation บนตำแหน่ง IL2RA สัมพันธ์กับการเกิดอาการของโรคคอพอกแบบเป็นพิษในเด็กมากขึ้น[6] การแสดงออกของ short non-coding RNA ชนิด miRNA-154, -376b และ -431 ใน PBMC ลดลงในผู้ป่วยโรคคอพอกแบบเป็นพิษ[7] อย่างไรก็ตามกลไกที่จะศึกษาในงานวิจัยนี้คือกระบวนการ Histone modification ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหมู่อะเซทิลและหมู่เมทิลที่ตำแหน่งกรดอะมิโนต่าง ๆ บนหางโปรตีนฮิสโตน การเปลี่ยนแปลงลำดับดังกล่าวจะกำหนดการขดตัวหรือคลายตัวของสายดีเอ็นเอรอบโปรตีนฮิสโตน ส่งผลให้การเข้าถึง promotor ของ transcription factor เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย[8] โดยจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในลำดับถัดไป

โปรตีนฮิสโตน (Histone protein) เป็นส่วนประกอบหนึ่งของโครมาติน เกี่ยวข้องกับการขดตัวและคลายตัวของสายดีเอ็นเอและการแสดงออกของสารพันธุกรรม ประกอบด้วย 8 หน่วยย่อย คือ H2A 2 หน่วยย่อย H2B 2 หน่วยย่อย H3 2 หน่วยย่อย และ H4 2 หน่วยย่อย ในหน่วยย่อย H3 และ H4 จะมีหาง (Histone tail) ซึ่ง

ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไลซีน อาร์จินีน ซีรีน ทรีโอนีน และไซโทซีน เรียงต่อกัน[8] (รูปที่ 1.2) การเรียกชื่อกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่งจะขึ้นต้นด้วยชนิดหน่วยย่อยของโปรตีนฮิสโตน ตามด้วยตัวย่อของกรดอะมิโน และหมายเลขตำแหน่งของกรดอะมิโน เช่น ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน 27 บนหางฮิสโตนโปนติน H3 คือ H3K27



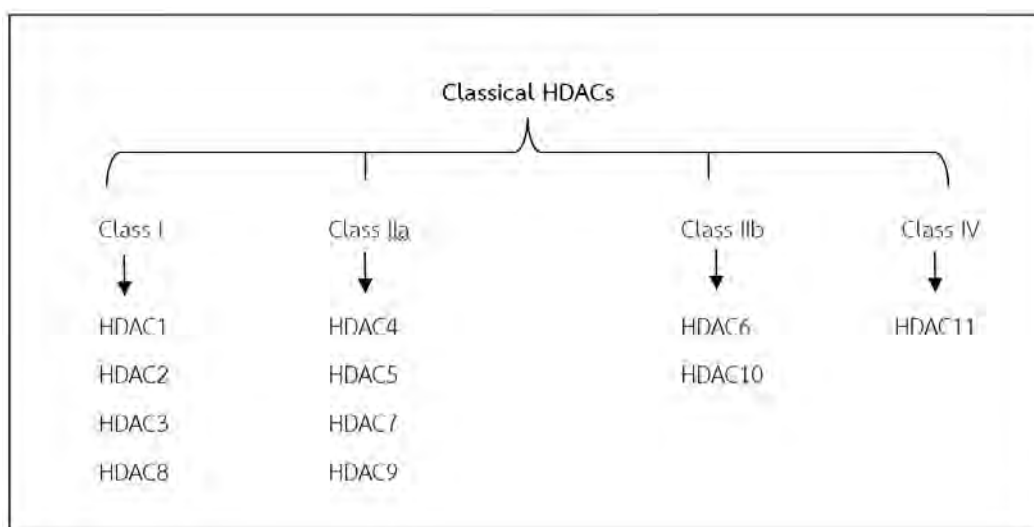
รูปที่ 1.2 : ตำแหน่งกรดอะมิโนบน Histone protein H3

กลุ่มเอนไซม์ Histone deacetylase (HDAC) ทำหน้าที่ดึงหมู่อะเซทิลออกจากหางโปรตีนฮิสโตนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดไลซีน ส่งผลให้เกิดการหดตัวของสายดีเอ็นเอรอบโปรตีนฮิสโตนซึ่งยับยั้งกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม กลุ่มเอนไซม์ HDAC ถูกแบ่งออกเป็น class คือ HDAC I IIa IIb III และ IV[9] (รูปที่ 1.3) ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาเอนไซม์ HDAC class IIa ชนิด HDAC4 ที่ทำงานดึงหมู่อะเซทิลในกระบวนการ Histone deacetylation ที่ตำแหน่ง H3K9 การดึงหมู่อะเซทิลจะส่งผลยับยั้งการแสดงออกของสารพันธุกรรม[9]

กลุ่มเอนไซม์ Histone methyltransferase (HMT) ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลลงบนหางโปรตีนฮิสโตนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดไลซีนและอาร์จินีน[10] กลุ่มเอนไซม์ HMT สามารถทำให้เกิดเป็น mono-, di- และ tri-methylation ได้ ส่งผลให้เกิดการหดตัวหรือคลายตัวของสายดีเอ็นเอรอบโปรตีนฮิสโตนซึ่งยับยั้งหรือกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมก็ได้[10] ซึ่งในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงบนกรดอะมิโนทั้งสองชนิดโดยการทำงานของเอนไซม์ HMT ในการเติมหมู่เมทิลลงบนหางโปรตีนฮิสโตนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดไลซีน คือ เอนไซม์ Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) ทำงานที่ตำแหน่ง H3K27 โดยผลของการเติมหมู่เมทิล 1 หมู่ จะส่งผลให้มีการถอดรหัสของสารพันธุกรรม ในขณะที่การเติมหมู่เมทิล 2 และ 3 หมู่ จะส่งผลยับยั้งการแสดงออกของสารพันธุกรรม และเอนไซม์ HMT ในการเติมหมู่เมทิลลงบนหางโปรตีนฮิสโตนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีน คือ เอนไซม์ Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) ทำงานที่ตำแหน่ง H3R8 ผลของการเติมหมู่เมทิล 1 2 และ 3 หมู่ จะไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของสารพันธุกรรม แต่ที่ตำแหน่ง H4R3 ผลของการเติม

หมู่เมทิล 2 หมู่อย่างสมมาตร จะไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของสารพันธุกรรม ในขณะที่การเติมหมู่เมทิล 1 หมู่ และ 2 หมู่อย่างไม่สมมาตร จะส่งผลให้มีการถอดรหัสของสารพันธุกรรม[10] (ตารางที่ 1.1)

จากผลการศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB จะมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ HDAC4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[11] (รูปที่ 1.4 ก) สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC4 คือ Tasquinimod สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะป้องกันโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[11] (รูปที่ 1.4 ข) นอกจากนั้นจากผลการศึกษาในงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB จะมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ EZH2 และ PRMT5 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[11] (รูปที่ 1.5 ก) สารยับยั้งเอนไซม์ EZH2 คือ DZNeP และสารยับยั้งเอนไซม์ PRMT5 คือ GSK591 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[12] (รูปที่ 1.5 ข) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ Histone deacetylase และ Histone methyltransferase ร่วมกัน ต่อการเพิ่มจำนวนและการสร้าง Cytokine ชนิด IL-6 และ hyaluronan ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ ผ่านกระบวนการ Histone modification ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้าว่าการยับยั้งเอนไซม์สองชนิดนี้ร่วมกันมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารยับยั้งเพียงชนิดเดียว[13] ทดสอบประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันของสารยับยั้งโดยเลือกชนิดและความเข้มข้นที่ใช้จากงานวิจัยก่อนหน้า[11,12] คือ สารยับยั้ง Tasquinimod ความเข้มข้น 20 μ M สารยับยั้ง DZNeP ความเข้มข้น 6 μ M และสารยับยั้ง GSK591 ความเข้มข้น 5 μ M

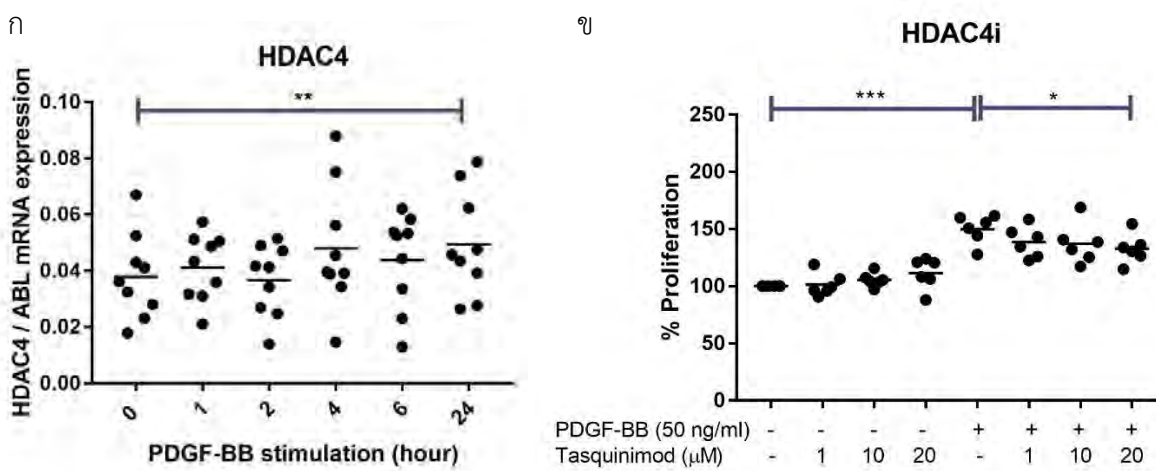


รูปที่ 1.3 : ชนิดของเอนไซม์ HDAC ที่แบ่งตาม Class

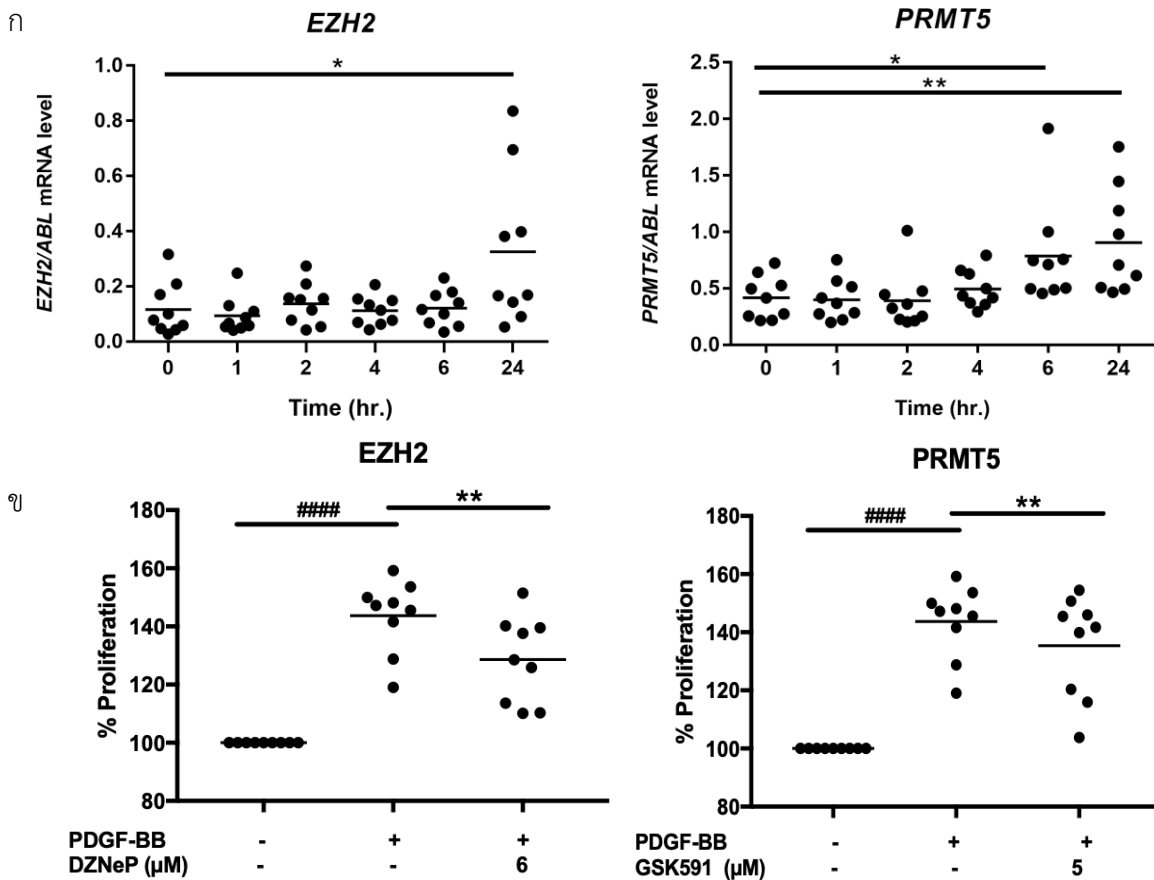
ตารางที่ 1.1 : การทำงานของเอนไซม์ Histone methyltransferase ที่แตกต่างกันตามจำนวนหมู่เมทิล และ ตำแหน่งบนหางโปรตีนฮิสโตน[14]

Histone and residues	State of methylation			HMTs
	Lysine	me1	me2	
H3K9	A	R	R	G9A
H3K27	A	R	R	EZH1, EZH2
H3K79	-	-	A or R	DOT1
Arginine	me1	me2a	me2s	
H3R8	-	-	-	me2s: PRMT5
H4R3	-	A	-	me2s: PRMT5

A หมายถึงมีการถอดรหัสของสารพันธุกรรมได้ และ R หมายถึงยับยั้งการแสดงออกของสารพันธุกรรม



รูปที่ 1.4 : ความเกี่ยวข้องของกับการทำงานของเอนไซม์ HDAC4 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB โดยส่งผลให้ (ก) ระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ HDAC4 เพิ่มขึ้น (ข) เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod แล้วการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะป้องกันโรคลดลง[11]



รูปที่ 1.5 : ความเกี่ยวข้องของกับการทำงานของเอนไซม์ EZH2 และ PRMT5 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB โดยส่งผลให้ (ก) ระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ EZH2 และ PRMT5 เพิ่มขึ้น (ข) เมื่อใช้สารยับยั้ง DZNeP และ GSK591 แล้วการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาลดลง[12]

บทที่ 2

อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์

- 1.) ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรอง ขนาด 25 และ 175 ตารางเซนติเมตร (Thermo Fisher Inc., China)
- 2.) ไมโครเพลต 12 และ 96 หลุม (Thermo Fisher Inc., China)
- 3.) หลอดไมโครเซนติพีวีจพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen Scientific Inc., NY, USA)
- 4.) หลอด cryovial (Life Science Products Inc., CO, USA)
- 5.) เซอโรโลคัลปิเปตต์ ขนาด 10 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Inc., USA)
- 6.) ไมโครปิเปตต์ ขนาด P10, P100, P200, P1000 (Eppendorf Inc., Germany)
- 7.) ไมโครปิเปตต์ทิวป์ ขนาด 10, 200, 300 และ 1000 ไมโครลิตร (Thermo Fisher Inc., USA)
- 8.) หลอดฟอลคอน (Falcon Tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Inc., USA)

2.2 เคมีภัณฑ์

- 1.) อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (lifesciences., MA, USA)
- 2.) ยาปฏิชีวนะเจนตาไมซิน Gentamicin (Life Technologies Inc., NY, USA)
- 3.) ซีรั่มฟิวส์ (Fetal Bovine Serum; FBS) (Life Technologies Inc., Germany)
- 4.) 0.25% ทริปซิน/อีดีทีเอ (Trypsin/EDTA) (Life Technologies Inc., NY, USA)
- 5.) Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) (BioLegend Inc., CA, USA)
- 6.) 1% เมทิลีนบลู (Methylene blue) (Merck Inc., Germany)
- 7.) Histone deacetylase inhibitors (HDACi) ชนิด Tasquinimod (Selleck Chemicals Inc., TX, USA)
- 8.) Histone methyltransferase inhibitors (HMTi) ชนิด DZNeP และ GSK591 (Selleck Chemicals Inc., TX, USA)
- 9.) LDH-cytotoxicity colorimetric assay kit II (BioVision Inc., CA, USA)
- 10.) Human IL-6 ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend Inc., CA, USA)
- 11.) Hyaluronan DuoSet ELISA (R&D system Inc., MN, USA)

ตารางที่ 2.1 : เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ที่ใช้ในการทดลองและข้อมูลเบื้องต้นของแต่ละเซลล์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา (TH)	เพศ	CAS*
TH8	Male	1/7
TH12	Female	0/7
TH27	Male	0/7

*Clinical Activity Score (CAS) คือ ค่าตัวเลขที่ใช้ในการประเมินความรุนแรงการอักเสบของตา

ตารางที่ 2.2 : แสดงตำแหน่งของเอนไซม์ที่จำเพาะกับสารยับยั้ง และความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง

Inhibitors	Target	Concentration (μM) [11,12]
HDAC inhibitor		
Tasquinimod	H3K9 HDAC4	20
HMT inhibitor		
DZNeP	H3K27 EZH2	6
GSK591	H3R8/H4R3 PRMT5	5

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ใช้ในการทดลองได้รับมาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยได้รับมาในลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณรอบดวงตาจากการผ่าตัดผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ในระยะที่โรคสงบ (Inactive GO) ก่อนนำมาแยกเซลล์ การระบุเซลล์จะใช้ตัวอักษร TH ตามด้วยตัวเลขตามลำดับที่รับมา

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตากลูกเพาะเลี้ยงโดยอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในภาชนะ T175 flask ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์เจริญเต็ม flask แล้วจะ passage เซลล์สู่ flask ใหม่ โดยเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาอยู่ระหว่าง passage ที่ 4 – 12

3.2 การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

เซลล์ใน T175 flask จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate โดยแบ่งเป็นแต่ละสภาวะ และใน 1 สภาวะจะมี 6 ซ้ำ วิธีการทดลองจะทำได้โดยการนับเซลล์ โดยการเติม Phosphate buffered saline (PBS) ลงใน T175 flask แล้วเทออกเพื่อล้าง FBS ที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการต่อไป จากนั้นเติม Trypsin ปริมาตร 3 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจาก flask แล้วจึงเติม 10% FBS DMEM เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin จากนั้นย้ายเซลล์ใน flask มาใน Falcon tube ขนาด 15 mL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารน้ำทิ้งและทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งโดย 1% FBS DMEM ปริมาตร 1 mL ดูดสารละลาย ปริมาตร 10 μ L ผสมกับ Trypan blue ปริมาตร 10 μ L แล้วดู 10 μ L เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์เฉลี่ยด้วย haemocytometer และคำนวณปริมาตรที่จะใช้เพื่อให้ได้เซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 6,000 เซลล์ ใน 96 well plate ปริมาตรหลุมละ 50 μ L บ่มที่สภาวะเดียวกับสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะใน 96 well plate พร้อมทั้งจะถูกกระตุ้นต่อไป

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น ได้มาจาก (จำนวนเซลล์ที่นับได้/พื้นที่ของ haemocytometer ที่นับเซลล์) \times dilution factor $\times 10^4$

C_2 = ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดที่จะใช้ คือ 120,000 cells/mL

V_1 = ปริมาตรเซลล์ที่อยู่ใน 1% FBS DMEM

V_2 = ปริมาตร 1% FBS DMEM สำหรับ 96 well plate

จากนั้นเติมสารยับยั้งและสารกระตุ้นลงใน 96 well plate โดยมีสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

1. เซลล์ใน 1% FBS DMEM เป็นชุดควบคุมผลลบ (Low control)
2. เติม HDAC inhibitor
3. เติม HMT inhibitor
4. เติม HDAC และ HMT inhibitor ร่วมกัน inhibitor ระหว่าง Tasquinimod กับ DZNeP และ Tasquinimod กับ GSK591
5. เติม PDGF-BB
6. เติม PDGF-BB และ HDAC inhibitor
7. เติม PDGF-BB และ HMT inhibitor
8. เติม PDGF-BB HDAC inhibitor และ HMT inhibitor ระหว่าง Tasquinimod กับ DZNeP และ Tasquinimod กับ GSK591
9. เติม 10% FBS DMEM เพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก
10. เติม lysis reagent เพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก (High control) ในการทดลอง LDH assay บ่มที่สภาวะเดียวกับสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บ supernatant เพื่อใช้ใน LDH assay ต่อไป

โดยสารยับยั้งแต่ละชนิดส่งผลยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT ต่างชนิดกัน ในการศึกษาจะเลือกใช้สารยับยั้งที่จำเพาะกับชนิดของเอนไซม์[11,12] จากบริษัท Selleck Chemicals Inc. (TX, USA)

3.3 LDH assay

ทำ LDH assay เพื่อตรวจวัดความเป็นพิษของสารยับยั้งต่อเซลล์ โดยใช้ supernatant จากหลุมในแต่ละสภาวะ 2 หลุม ปริมาตร 2.5 μL ใช้ชุดควบคุมผลลบเป็น 1% FBS DMEM 2.5 μL และชุดควบคุมผลบวกเป็น LDH มาตรฐาน 1.25 μL จากนั้นเติม LDH reagent หลุมละ 25 μL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่า absorbance ที่ 450 nm โดยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณ % Cytotoxicity สามารถสรุปผลการทดลองว่าสารยับยั้งไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมี % Cytotoxicity น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left(\frac{x - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \right) \times 100$$

X = ค่า absorbance ที่วัดได้

Low control = ค่า absorbance ของ 1% FBS DMEM

High control = ค่า absorbance ของ LDH มาตรฐาน

3.4 Cell proliferation assay

ทำ cell proliferation assay เพื่อตรวจสอบความสามารถในการลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของสารยับยั้ง โดยดูดสารละลายทั้งหมดใน 96 well plate จากข้อ 3.2 ออกด้วย multichannel pipette เติม PBS ปริมาตร 200 μ L ต่อหลุมเพื่อล้างสารละลายออก เติม 20% formaldehyde/PBS ปริมาตร 50 μ L ต่อหลุม เพื่อ fix cell บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 วันขึ้นไป จากนั้นดูดสารละลายออกทั้งหมด เติม 1% Methylene blue ใน 0.01 M boric acid (pH 8.5) ปริมาตร 50 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อย้อมเซลล์ และล้างส่วนเกินด้วย 0.01 M boric acid (pH 8.5) และเติม 1:1 (v/v) Absolute Ethanol: 0.1 M HCl ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม เพื่อชะสีที่ย้อมติดภายในเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่า absorbance ที่ 620 nm โดยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณ % Proliferation

$$\% \text{ Proliferation} = \frac{x}{\text{control}} \times 100$$

X = ค่า absorbance ที่วัดได้ในสภาวะเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ

Control = ค่า absorbance ของ เซลล์ที่เลี้ยงใน 1% FBS DMEM

3.5 วัด Cytokine production โดยใช้เทคนิค ELISA

กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วยวิธีดังข้อ 3.2 โดยใช้ 12 well plate ที่มีเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาหลุมละ 100,000 เซลล์ บ่มที่สภาวะเดียวกับสภาวะเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อ

- วัดระดับ Cytokine ชนิด IL-6 โดย Human IL-6 ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend Inc., CA, USA)
 - 1.) เติม Capture Antibody solution ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสข้ามคืน
 - 2.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 4 ครั้ง เติม 1X Assay diluent A ปริมาตร 200 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 550 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 - 3.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 4 ครั้ง เติม Standards และตัวอย่าง 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - 4.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 4 ครั้ง เติม Detection Antibody solution 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- 5.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 4 ครั้ง เติม Avidin-HRP solution 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
 - 6.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 5 ครั้ง โดยทิ้งให้ระยะเวลาล้างแต่ละครั้ง 30-60 วินาที เติม TMB substrate solution 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้วบ่มในความมืดเป็นเวลา 15 นาที
 - 7.) เติม Stop solution 100 μ L ต่อหลุม
 - 8.) วัด absorbance ที่ 450 nm โดยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณระดับ IL-6 (pg/mL) เทียบกับชุดควบคุมมาตรฐาน
- วัดระดับ Hyaluronan โดย Hyaluronan DuoSet ELISA (R&D system Inc., MN, USA)
- 1.) เติม Hyaluronan capture reagent ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสข้ามคืน
 - 2.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer ปริมาตร 400 μ L 3 ครั้ง เติม Reagent diluent ปริมาตร 200 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 550 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 - 3.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 3 ครั้ง เติม Standard และตัวอย่าง 50 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - 4.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 3 ครั้ง เติม Biotinylated Hyaluronan detection reagent 50 L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - 5.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 3 ครั้ง เติม Streptavidin-HRP B 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
 - 6.) ล้างเพลทด้วย Wash buffer 3 ครั้ง เติม Substrate solution 100 μ L ต่อหลุม ปิดเพลท แล้วบ่มในความมืดเป็นเวลา 20 นาที
 - 7.) เติม Stop solution 100 μ L ต่อหลุม วัด absorbance ที่ 450 nm โดยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณระดับ Hyaluronan (pg/mL) เทียบกับชุดควบคุมมาตรฐาน

3.6 วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ paired t-test

ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ paired t-test เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมผลลบ ผลการทดลองมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

กราฟที่แสดงในผลการทดลอง แสดงจุด (•) แทนแต่ละคนไข้ ซีด (—) แทนค่าเฉลี่ย และ * แทน $P < 0.05$

บทที่ 4

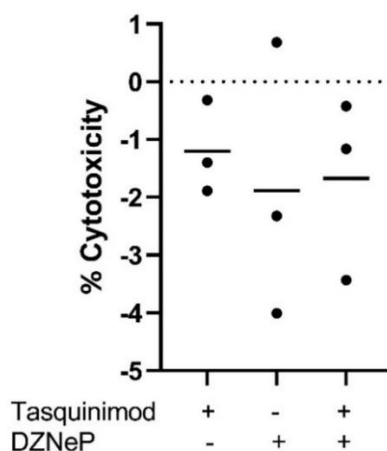
ผลการทดลอง

4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน

ผลการทดลองทดสอบความเป็นพิษของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 โดย LDH assay ในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 แสดง % Cytotoxicity เฉลี่ยของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod DZNeP และ Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP ต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่มีการใช้สารยับยั้งสภาวะใดที่มี % Cytotoxicity มากกว่า 0 จึงสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าการใช้สารยับยั้งทั้งแบบเดี่ยวและแบบร่วมกันไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 4.1 : % Cytotoxicity เฉลี่ยของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา	% Cytotoxicity		
	Tasquinimod	DZNeP	Tasquinimod และ DZNeP
TH8	-1.3986	-4.0051	-3.4329
TH12	-1.8882	-2.3239	-1.1619
TH27	-0.3151	0.6828	-0.4202
ค่าเฉลี่ย	-1.2006	-1.8821	-1.6717



รูปที่ 4.1 : กราฟแสดง % Cytotoxicity เฉลี่ยของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP (n=3)

4.2 ประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB โดย cell proliferation assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อกำหนดให้สถานะควบคุม 1% FBS DMEM มี % Proliferation เท่ากับ 100% จะได้ค่า % Proliferation ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบสถานะควบคุมที่ใช้ 1% FBS DMEM กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB พบว่า % Proliferation เพิ่มขึ้นประมาณ 50% จากสถานะควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย PDGF-BB ซึ่งสามารถจำลองสถานะการเกิดโรคได้

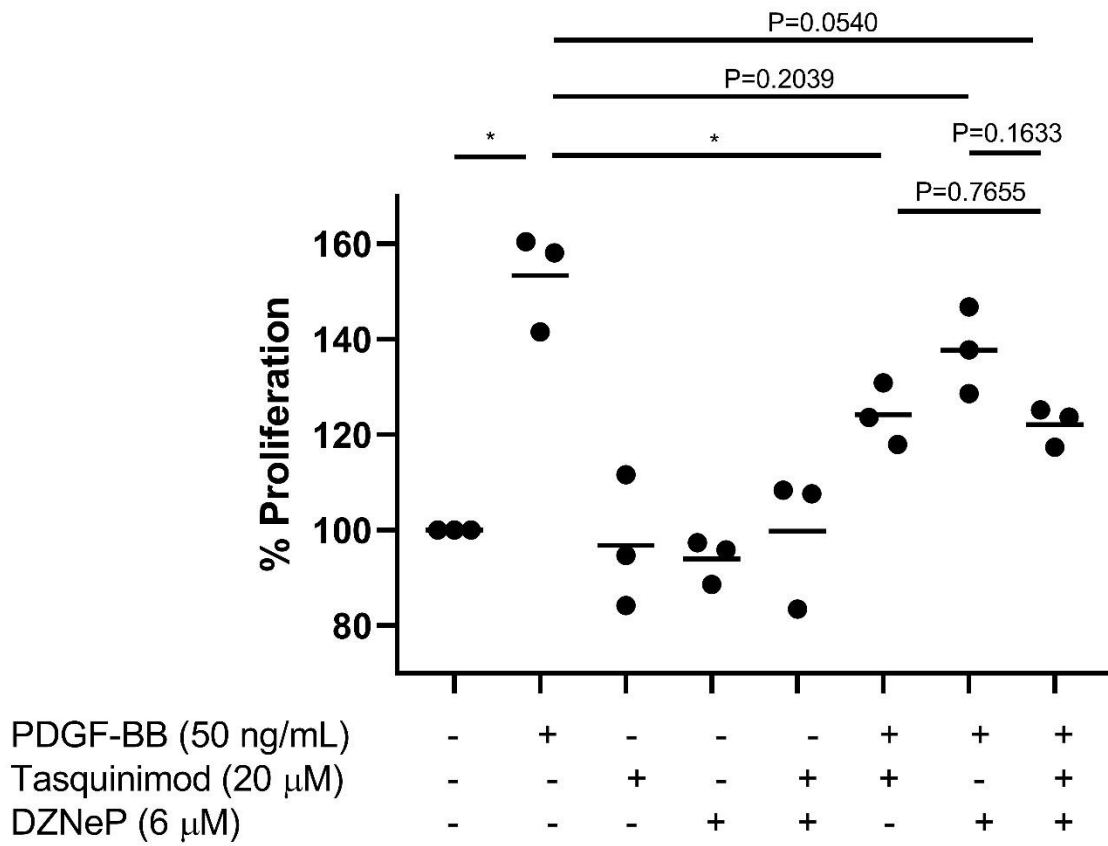
อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ % Proliferation ของสถานะควบคุมกับสถานะที่ใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ($P = 0.7283$) สถานะที่ใช้สารยับยั้ง DZNeP ($P = 0.1555$) และสถานะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด ($P = 0.9849$)

เมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod พบว่า % Proliferation ลดลงประมาณ 30% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกันกับสารยับยั้ง DZNeP % Proliferation มีแนวโน้มลดลงประมาณ 15% ($P = 0.2039$)

เมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด % Proliferation มีแนวโน้มลดลง ($P = 0.0540$) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod กับสถานะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด พบว่า % Proliferation มีแนวโน้มลดลงประมาณ 2% ($P = 0.7655$) เช่นเดียวกันกับเมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง DZNeP กับสถานะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด % Proliferation มีแนวโน้มลดลงประมาณ 15% ($P = 0.1633$) โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 : % Proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ

เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา	% Proliferation							
	1% FBS DMEM	PDGF-BB	Tasquinimod	DZNeP	Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod	PDGF-BB และ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP
TH8	100.0000	141.5408	94.6675	95.8910	108.4028	117.9977	137.8106	125.2399
TH12	100.0000	158.0932	84.1685	88.6029	83.4442	130.8763	146.7562	117.3570
TH27	100.0000	160.4999	111.5954	97.3729	107.6292	123.6274	128.5845	123.6739
ค่าเฉลี่ย	100.0000	153.3780	96.8105	93.9556	99.8254	124.1671	137.7171	122.0903



รูปที่ 4.2 : กราฟแสดง % Proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ (n=3)

4.3 ประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันต่อระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาผลิต

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ต่อระดับการผลิต Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาไปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB โดยเทคนิค ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า IL-6 ในแต่ละสภาวะเป็นไปตามดังแสดงในตารางที่ 4.3

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบสภาวะควบคุมที่ใช้ 1% FBS DMEM กับสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.3408$) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นเซลล์ในการทดลองนี้ได้

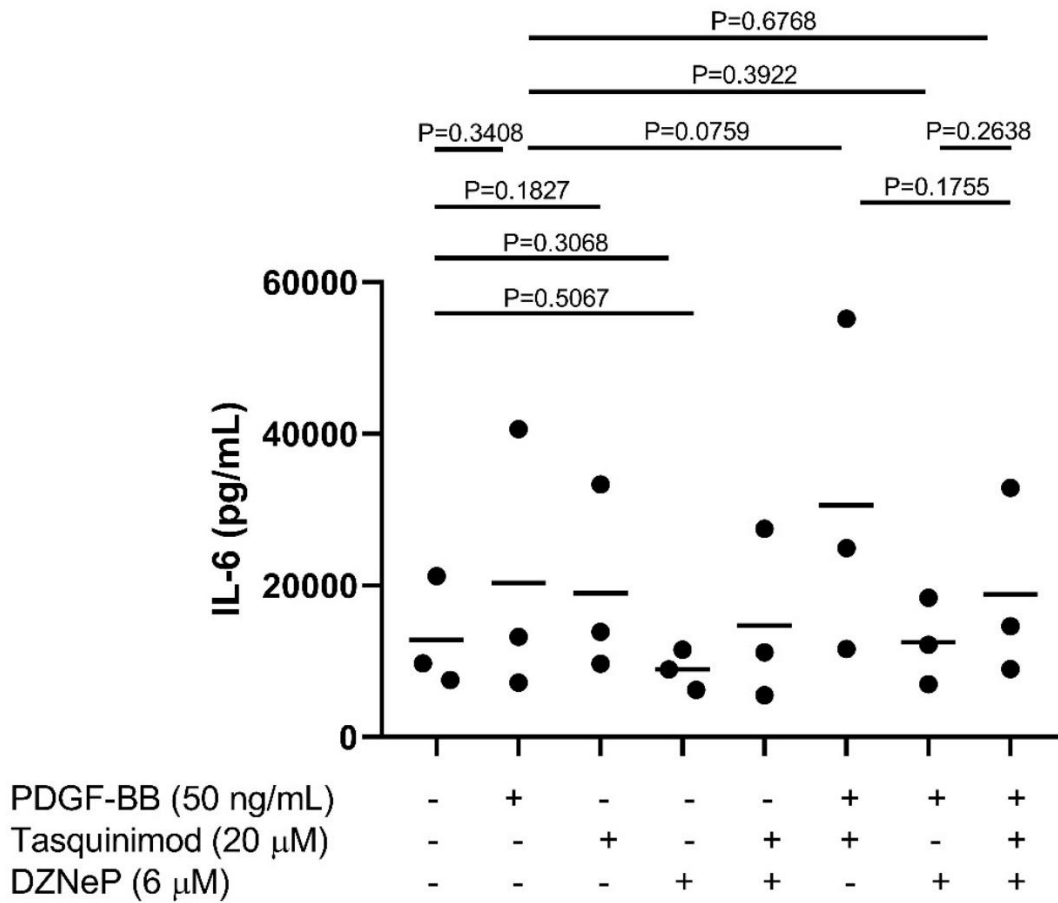
ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสภาวะควบคุมกับสภาวะที่ใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ($P=0.1827$) สารยับยั้ง DZNeP ($P=0.3068$) และสารยับยั้งสองชนิด ($P=0.5067$) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้สารยับยั้ง DZNeP ระดับ IL-6 มีแนวโน้มลดลง

เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($P=0.0759$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง DZNeP ระดับ IL-6 มีแนวโน้มลดลง ($P=0.3922$)

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด ระดับ IL-6 มีแนวโน้มลดลง ($P=0.6768$) มากกว่าสภาวะที่ใช้สารยับยั้ง Tasquinimod เพียงอย่างเดียว และเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod กับการใช้สารยับยั้งสองชนิด พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มลดลง ($P=0.1755$) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารยับยั้ง DZNeP กับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิดระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($P=0.2638$) โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 : ระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ

เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา	IL-6 (pg/mL)							
	1% FBS DMEM	PDGF-BB	Tasquinimod	DZNeP	Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod	PDGF-BB และ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP
TH8	21200.52	40647.21	33341.37	11547.69	27478.39	55181.9	18363.08	32895.4
TH12	9719.988	13209.04	13873.49	8940.006	11196.36	24948.92	12175.04	14635.69
TH27	7537.157	7163.033	9652.171	6237.499	5548.796	11640.43	6994.325	8962.631
ค่าเฉลี่ย	12819.22	20339.76	18955.68	8908.397	14741.18	30590.41	12510.81	18831.24



รูปที่ 4.3 : กราฟแสดงระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปน จากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ (n=3)

4.4 ประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันต่อระดับ Hyaluronan ที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตามผลิต

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ต่อระดับการผลิต Hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB โดยเทคนิค ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า Hyaluronan ในแต่ละสภาวะเป็นไปตามดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบสภาวะควบคุมที่ใช้ 1% FBS DMEM กับสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB พบว่าระดับ Hyaluronan มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.1251$) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นเซลล์ในการทดลองนี้ได้

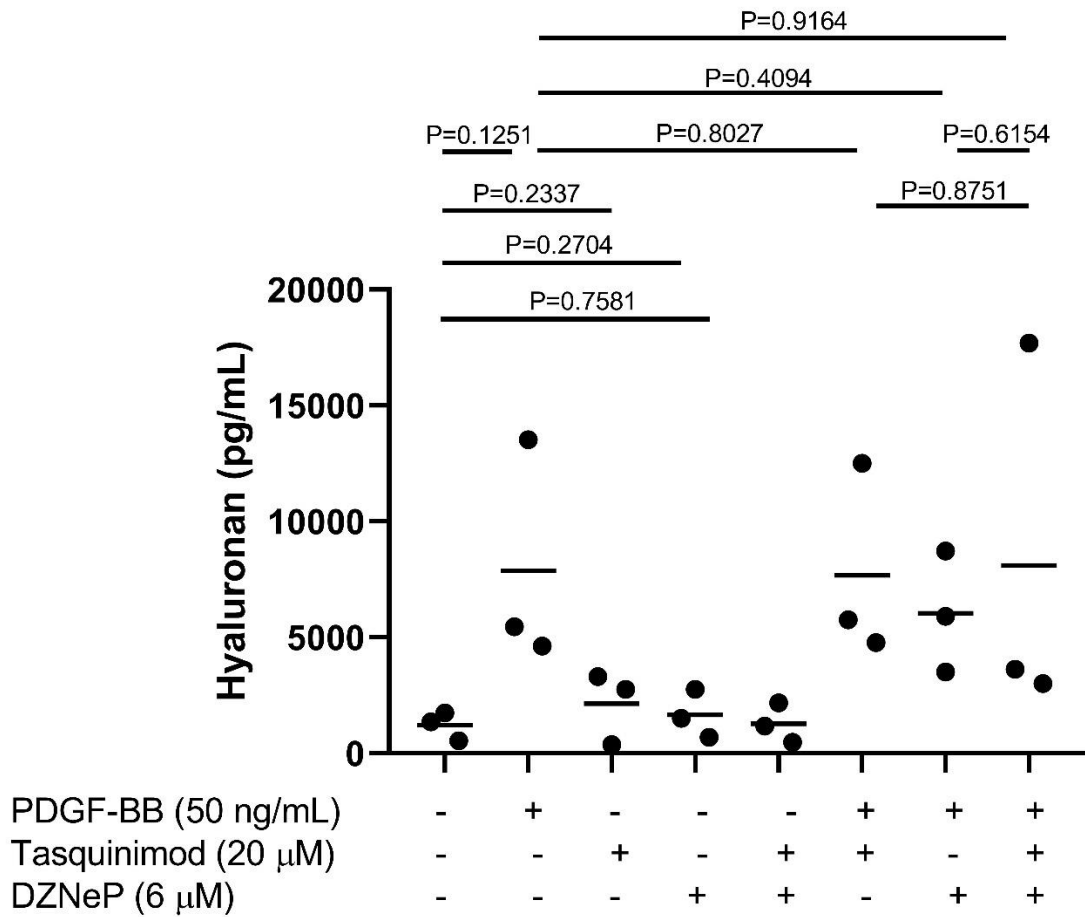
ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ Hyaluronan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสภาวะควบคุมกับสภาวะที่ใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ($P=0.2337$) สภาวะที่ใช้สารยับยั้ง DZNeP ($P=0.2704$) และสภาวะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด ($P=0.7581$)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ Hyaluronan ในสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ Hyaluronan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.8027$) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้สารยับยั้ง DZNeP ระดับ Hyaluronan มีแนวโน้มลดลง ($P=0.4094$)

เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ Hyaluronan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.9164$) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod กับสภาวะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด พบว่าระดับ Hyaluronan มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($P=0.8751$) เช่นเดียวกันกับเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง DZNeP กับสภาวะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด ($P=0.6154$) โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.4 : ระดับ Hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ

เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา	Hyaluronan (pg/mL)							
	1% FBS DMEM	PDGF-BB	Tasquinimod	DZNeP	Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod	PDGF-BB และ DZNeP	PDGF-BB และ Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP
TH8	1735.734	13520.26	3302.027	2763.964	2181.99	12510.72	8725.715	17690.95
TH12	1352.39	4621.382	2750.472	1501.719	1168.075	5755.4	5911.75	3618.434
TH27	539.1118	5462.339	370.4882	688.0168	480.9192	4782.348	3507.907	3010.094
ค่าเฉลี่ย	1209.079	7867.993	2140.996	1651.233	1276.995	7682.822	6048.457	8106.491



รูปที่ 4.4 : กราฟแสดงระดับ Hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ในแต่ละสภาวะ (n=3)

4.5 ประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกันต่อระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาผลิต

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกัน ต่อระดับการผลิต Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB โดยเทคนิค ELISA IL-6 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า IL-6 ในแต่ละสถานะเป็นไปตามดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบสถานะควบคุมที่ใช้ 1% FBS DMEM กับสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0962$) จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นเซลล์ในการทดลองนี้ได้

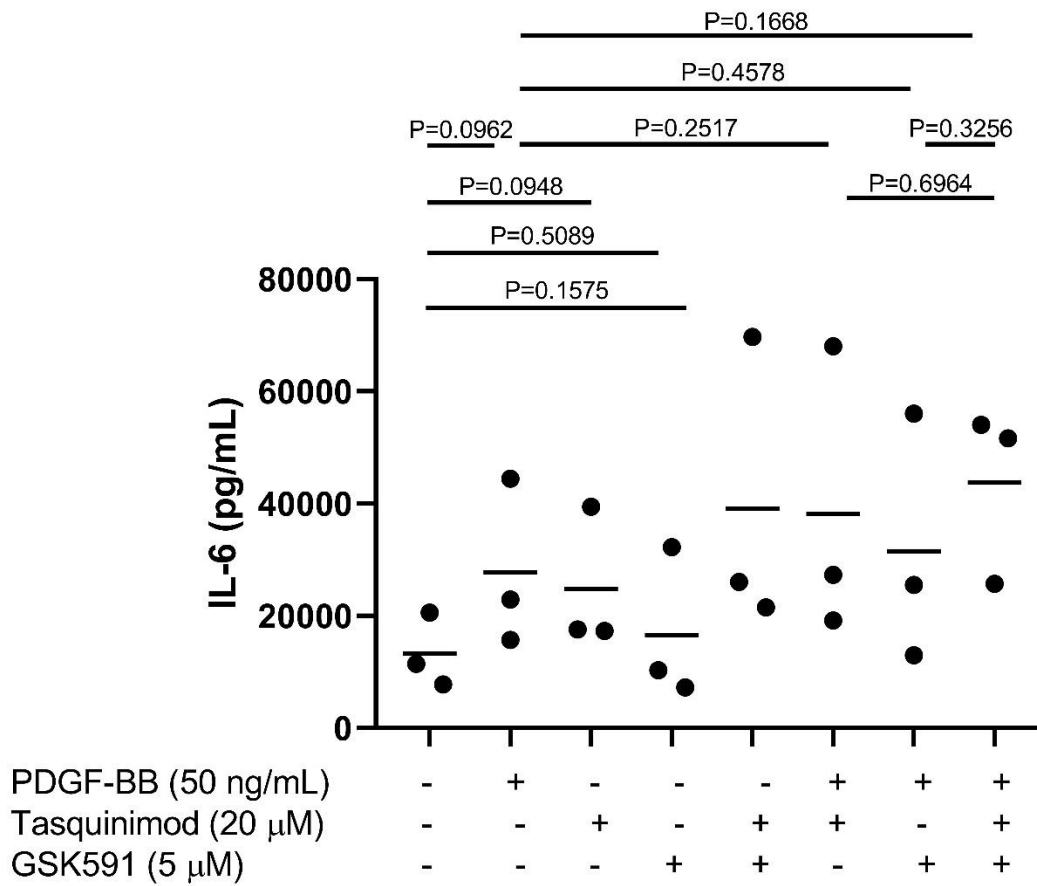
ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสถานะควบคุมกับสถานะที่ใช้สารยับยั้ง GSK591 ($P=0.5089$) อย่างไรก็ตามระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้ง Tasquinimod ($P=0.0948$) และสถานะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด ($P=0.1575$)

เมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod พบว่าระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($P=0.2517$) เช่นเดียวกันกับเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ใช้สารยับยั้ง GSK591 ($P=0.4578$)

เมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.1668$) เมื่อเปรียบเทียบสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod กับสถานะที่ใช้สารยับยั้งสองชนิด ระดับ IL-6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($P=0.6964$) เช่นเดียวกันกับเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้ง GSK591 กับสถานะที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด ($P=0.3256$)

ตารางที่ 4.5 : ระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ในแต่ละสภาวะ

เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ จากดวงตา	IL-6 (pg/mL)							
	1% FBS DMEM	PDGF-BB	Tasquinimod	GSK591	Tasquinimod ร่วมกับ GSK591	PDGF-BB และ Tasquinimod	PDGF-BB และ GSK591	PDGF-BB และ Tasquinimod ร่วมกับ GSK591
TH8	20582.9	44456.04	39454.18	32226.29	69706.35	68060.97	56051.29	51629.3
TH12	11462.8	22917.08	17534.97	10276.85	26017.31	27276.95	25529.72	54040.74
TH27	7758.809	15711.54	17333.1	7264.969	21480.01	19181.54	12960.71	25720.97
Average	13268.17	27694.88	24774.08	16589.37	39067.89	38173.16	31513.91	43797



รูปที่ 4.5 : กราฟแสดงระดับ Cytokine ชนิด IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปน จากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ในแต่ละสภาวะ (n=3)

บทที่ 5

วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง 4.1 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ทั้งแบบเดี่ยวและแบบร่วมกันไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จึงสามารถนำสารยับยั้งทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาาร่วมกันได้ (Tasquinimod 20 μ M และ DZNeP 6 μ M) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่รายงานการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT ร่วมกันโดยไม่ส่งผลข้างเคียงหลายงาน เช่น การใช้สารยับยั้ง SAHA ต่อเอนไซม์ HDAC และ DZNeP ต่อเอนไซม์ HMT ร่วมกันในการรักษาโรคมะเร็งปอด[13] หรือการใช้สารยับยั้ง Belinostat ต่อเอนไซม์ HDAC และ DZNeP ต่อเอนไซม์ HMT ชนิด EZH2 ร่วมกันในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว[15]

จากผลการทดลองที่ 4.2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันไม่มีความแตกต่างในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB เปรียบเทียบกับการใช้สารยับยั้งชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้สารยับยั้งสองชนิดลดการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้มากกว่าการใช้สารยับยั้งชนิดเดียว สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ EZH2 ร่วมกันลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งรังไข่[16] อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับอีกงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สารยับยั้ง DZNeP ลดระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้มากกว่าสารยับยั้ง Tasquinimod [11,12] จึงต้องศึกษาเพื่อยืนยันผลของการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันต่อไป

จากการทดลองที่ 4.1 การทดลอง LDH assay มีชุดควบคุมผลลบเป็นสถานะที่เติม 1% FBS DMEM ซึ่งสารละลายมีสีชมพู ทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดค่า absorbance ที่ 450 nm ได้ อย่างไรก็ตามสามารถยืนยันผลการทดลองจากการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ 4.1 กับผลการทดลอง cell proliferation assay จากการทดลองที่ 4.2 เนื่องจาก cell proliferation assay เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังยึดติดบน plate และติดสีย้อมหลังจากเติมสารยับยั้ง จึงอนุมานได้ว่าสามารถวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดได้ และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสถานะที่ใช้สารยับยั้ง Tasquinimod DZNeP และ Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา มี % Proliferation น้อยกว่าสถานะควบคุม 1% FBS DMEM เมื่อพิจารณาทั้งสองผลการทดลองร่วมกันจึงสามารถยืนยันได้ว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ร่วมกับ DZNeP ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

จากผลการทดลองที่ 4.3 สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันไม่มีความแตกต่างของระดับ IL-6 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB เปรียบเทียบกับการใช้สารยับยั้งชนิดเดียว

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับของ IL-6 เมื่อใช้สารยับยั้ง DZNeP เพียงชนิดเดียวมีแนวโน้มลดลงมากกว่าการใช้สารยับยั้งสองชนิดร่วมกัน

จากผลการทดลองที่ 4.4 สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกันไม่มีความแตกต่างของระดับ Hyaluronan เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB เปรียบเทียบกับการใช้สารยับยั้งชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองที่ 4.5 สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกันไม่มีความแตกต่างของระดับ IL-6 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB เปรียบเทียบกับการใช้สารยับยั้งชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการใช้สารยับยั้งสองชนิดเพิ่มระดับ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตามากกว่าการใช้สารยับยั้งชนิดเดียว จึงอาจไม่สามารถใช้สารยับยั้งสองชนิดนี้ร่วมกันในการลดระดับ IL-6 ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod ส่งผลให้ระดับ IL-6 มากขึ้นมากกว่าการใช้สารยับยั้งสองชนิดร่วมกัน เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ 4.3 จึงอาจกล่าวได้ว่าสารยับยั้ง Tasquinimod ส่งผลเพิ่มระดับ IL-6 ในการทดลองก่อนหน้านี้ให้ผลการทดลองว่าสารยับยั้ง Tasquinimod ส่งผลเพิ่มระดับ IL-6 เช่นเดียวกัน[11]

เนื่องจากในแต่ละการทดลองมีจำนวนผู้ป่วย (n) 3 คน ซึ่งเป็นจำนวนขั้นต่ำที่สามารถคำนวณทางสถิติได้จากผลการทดลองที่ 4.3 4.4 และ 4.5 จะเห็นว่ามีค่าซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ป่วยค่าหนึ่งที่ทำให้ค่าที่แตกต่างจากกลุ่มทดลอง ค่านั้นเป็นตัวแทนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วย TH8 จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีความโน้มเอียงบางอย่างเกิดขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตานี้ และเมื่อพิจารณาค่า CAS จะเห็นว่าผู้ป่วยมีค่า CAS เท่ากับ 1 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาอื่น ๆ ที่มีค่าเท่ากับ 0 ลักษณะของโรคที่เกิดมากกว่านี้อาจเป็นผลที่ทำให้ได้ผลของการใช้สารยับยั้งแตกต่างจากค่าอื่น

ผลการทดลองที่ 4.3 และ 4.5 แตกต่างกันที่ชนิดของสารยับยั้ง HMT ที่ใช้ในการทดลอง โดยการทดลองที่ 4.3 ใช้สารยับยั้ง DZNeP ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ lysine HMT ส่วนการทดลองที่ 4.5 ใช้สารยับยั้ง GSK591 ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ arginine HMT เมื่อพิจารณาที่สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย PDGF-BB ร่วมกับการใช้สารยับยั้งสองชนิด จะเห็นได้ว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ลดระดับ IL-6 ได้มากกว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ HDAC ทำงานร่วมกับเอนไซม์ lysine HMT ได้ดีกว่าเอนไซม์ arginine HMT เนื่องจากเอนไซม์ HDAC ทำงานบนทางโปรตีนฮิสโตนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดไลซีนเท่านั้น[9] งานวิจัยหลายงานรายงานถึงความสัมพันธ์ของเอนไซม์ HDAC และ EZH2 จากการทำงานร่วมกันบน polycomb repressive complex 2 (PRC2)[13,17,18] ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองในงานวิจัยนี้ที่การใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP ร่วมกัน ลดระดับ IL-6 ได้มากกว่าการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591 ร่วมกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้สารยับยั้ง GSK591 จะมีประสิทธิภาพน้อยในงานวิจัยนี้ แต่ก็มีงานวิจัยรายงานว่าเอนไซม์ PRMT5 เป็นหน่วยย่อยหนึ่งของ Histone deacetylase

complex[19] จึงอาจพัฒนาผลการทดลองด้วยการเปลี่ยนสารยับยั้งเอนไซม์ PRMT5 จากสารยับยั้ง GSK591 เป็นสารยับยั้งชนิดอื่น หรือลดการแสดงออกของยีน PRMT5 (knockout)

จากผลการทดลองที่ 4.3 และ 4.4 จะเห็นแนวโน้มว่าการใช้สารยับยั้ง DZNeP ชนิดเดียวมีประสิทธิภาพในการลด fibroblast activity ได้ดีกว่าการใช้สารยับยั้งสองชนิดร่วมกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารยับยั้ง Tasquinimod มีประสิทธิภาพในการลด fibroblast activity น้อย จากการทดลองก่อนหน้านี้ก็แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้ง Tasquinimod เพิ่ม fibroblast activity[11] ประกอบกับงานวิจัยอื่นที่การใช้สารยับยั้งร่วมกันมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ เช่น ทดลองใช้สารยับยั้ง SAHA ต่อเอนไซม์ HDAC และสารยับยั้ง DZNeP ต่อเอนไซม์ HMT ร่วมกันส่งผลเสริมฤทธิ์ให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งในปอด[13] หรือ ทดลองใช้สารยับยั้ง romidepsin ต่อเอนไซม์ HDAC และสารยับยั้ง GSK126 ต่อเอนไซม์ HMT ร่วมกันส่งผลเสริมฤทธิ์ให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองได้[17] ซึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารยับยั้ง SAHA และสารยับยั้ง romidepsin ที่เป็น pan inhibitor ซึ่งยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดกว่าสารยับยั้งที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นหากต้องการพัฒนาผลของการใช้สารยับยั้งสองชนิดร่วมกันให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจึงอาจเปลี่ยนชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT เพื่อทดลองคู่อื่น ๆ โดยอาจเลือกสารยับยั้งจากการศึกษาว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB แล้วส่งผลให้การแสดงออกของ mRNA ของยีนใดเพิ่มมากขึ้น และเลือกใช้สารยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ที่ยีนนั้นแสดงออก ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้าได้รายงานว่ายีนที่แสดงออกมากขึ้นคือยีน *HDAC3* และยีน *G9a*[11,12] จึงอาจทดลองใช้สารยับยั้ง RGFP966 ต่อเอนไซม์ HDAC3 และสารยับยั้ง BIX01294 ต่อเอนไซม์ G9a ร่วมกันในการทดลองต่อไปได้

โรคตาโปนจากไทรอยด์ยังมีการของโรคอื่น ๆ นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา การผลิต cytokines IL-6 และ Hyaluronan เช่น การเกิด adipogenesis ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือการผลิต collagen[4] จึงอาจตรวจสอบพยาธิสภาพที่กล่าวมาเพิ่มเติมได้เพื่อให้ผลการทดลองในงานวิจัยนี้แน่ชัดมากขึ้น นอกจากนั้นอาจเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งที่ใช้ หรือศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ HDAC และ HMT ร่วมกัน

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของสารยับยั้งเอนไซม์ HDAC คือ สารยับยั้ง Tasquinimod ร่วมกับสารยับยั้งเอนไซม์ HMT คือ สารยับยั้ง DZNeP และ GSK591 มีแนวโน้มในการลดระดับ fibroblast activity อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองทั้งหมดในการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ HDAC และ HMT ร่วมกันแสดงให้เห็นว่าการลดระดับการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในดวงตาไม่แตกต่างกับการใช้สารยับยั้ง Tasquinimod DZNeP หรือ GSK591 เพียงอย่างเดียว ดังนั้นในอนาคตอาจมีการพัฒนาผลของการใช้สารยับยั้งเหล่านี้ร่วมกัน หรือการใช้สารยับยั้งชนิดอื่นร่วมกันเพื่อให้ผลการทดลองที่ดีขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคตาโปนจากไทรอยด์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1 Smith, T. J. And L. Hegedus (2016). “Graves’ Disease.” N Engl J Med **375**(16): 1552-1565.
- 2 Bahn, R. S. (2010). “Graves’ ophthalmopathy.” N Engl J Med **362**(8): 726-738.
- 3 Virakul, S., et al. (2014). “Platelet-derived growth factor: a key factor in the pathogenesis of graves’ ophthalmopathy and potential target for treatment.” Eur Thyroid J **3**(4): 217-226.
- 4 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ห. ภ. ค. (2019). ภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์ (Medical immunology). เลขที่ 9/1205 หมู่ 1 ถนนสะแกงาม แขวงแสมดำ เขตบางขุนเทียนกรุงเทพฯ, ห้องหุ่นส่วนจำกัด สามลดา, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ห. ภ. ค.
- 5 Wang, B., et al. (2017). “The Emerging Role of Epigenetics in Autoimmune Thyroid Diseases.” Front Immunol **8**: 396.
- 6 Kyrgios, I., et al. (2020). “DNA methylation analysis within the IL2RA gene promoter in youth with autoimmune thyroid disease.” Eur J Clin Invest **50**(3): e13199.
- 7 Liu, R., et al. (2012). “Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves’ disease patients.” J Clin Endocrinol Metab **97**(6): E968-972.
- 8 Kimura, H. (2013). “Histone modifications for human epigenome analysis.” J Hum Genet **58**(7): 439-445.
- 9 Pang, M. And S. Zhuang (2010). “Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders.” J Pharmacol Exp Ther **335**(2): 266-272.
- 10 Araki, Y. And T. Mimura (2017). “The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases.” Mediators Inflamm **2017**: 2608605.
- 11 Ekronarongchai, S., et al. (2019). Roles of Histone Deacetylases in Orbital Fibroblasts from Graves’ Ophthalmopathy patients. The 31st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2019). Duangjitt Resort & Spa, Patong, Phuket, Thailand.
- 12 Visamol, S., et al. (2019). The Effect of Histone Methyltransferase in Orbital Fibroblast from Graves’ Ophthalmopathy. The 31st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2019). Duangjitt Resort & Spa, Patong, Phuket, Thailand.

- 13 Takashina, T., et al. (2016). "Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells." Cancer Sci **107**(7): 955-962.
- 14 Hyun, K., et al. (2017). "Writing, erasing and reading histone lysine methylations." Exp Mol Med **49**(4): e324
- 15 Vitkeviciene, A., et al. (2019). "HDAC and HMT Inhibitors in Combination with Conventional Therapy: A Novel Treatment Option for Acute Promyelocytic Leukemia." J Oncol **2019**: 6179573.
- 16 Wang, Y., et al. (2018). "Histone Deacetylase Inhibitors Synergize with Catalytic Inhibitors of EZH2 to Exhibit Antitumor Activity in Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type." Mol Cancer Ther **17**(12): 2767-2779.
- 17 Lue, J. K., et al. (2019). "Precision Targeting with EZH2 and HDAC Inhibitors in Epigenetically Dysregulated Lymphomas." Clin Cancer Res **25**(17): 5271-5283.
- 18 Huang, J. P. And K. Ling (2017). "EZH2 and histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in triple negative breast cancer cells by differentially increasing H3 Lys(27) acetylation in the BIM gene promoter and enhancers." Oncol Lett **14**(5): 5735-5742.
- 19 Izzo, A. And R. Schneider (2010). "Chatting histone modifications in mammals." Brief Funct Genomics **9**(5-6): 429-443.
- 20 Ribeiro, M. L., et al. (2019). "Recent Advances in the Targeting of Epigenetic Regulators in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma." Front Genet **10**: 986.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM	
DMEM	90 มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	10 มิลลิลิตร
Gentamicin	1 มิลลิลิตร
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ 1% FBS DMEM	
DMEM	49.45 มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	0.50 มิลลิลิตร
Gentamicin	0.05 มิลลิลิตร
3. Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4	
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	1.44 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.24 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
*ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์	
4. Freezing media 1	
DMEM	60 มิลลิลิตร
FBS	40 มิลลิลิตร
5. Freezing media 2	
DMEM	60 มิลลิลิตร
FBS	20 มิลลิลิตร
DMSO	20 มิลลิลิตร
6. สารละลาย PDGF-BB	
PDGF-BB	10 ไมโครกรัม
กรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิโมลาร์	ละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

*ละลายสาร PDGF-BB 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ 4 มิลลิโมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 6.1 : ค่า absorbance ที่ 450 nm จากการทดลอง LDH assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP (background=0.0408, Positive control=0.0800)

Orbital fibroblast	1% FBS	Tasquinimod	DZNeP	Tasquimimod +DZNep	Lysis
TH8	0.0446	0.0441	0.0423	0.0425	0.1234
	0.0449	0.0432	0.0409	0.0416	
TH12	0.0431	0.0413	0.0409	0.0419	0.1110
	0.0412	0.0404	0.0402	0.0408	
TH27	0.0424	0.0422	0.0404	0.0426	0.1377
	0.0426	0.0422	0.0459	0.0416	

ตารางที่ 6.2 : ค่า absorbance ที่ 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

Conditions	1% FBS	Tas	DZNeP	Tas +DZNeP	PDGF	PDGF +Tas	PDGF +DZNeP	PDGF+Tas +DZNeP	10% FBS
Replication1	0.5665	0.3846	0.4451	0.4064	0.7009	0.6538	0.6823	0.8195	0.7587
Replication2	0.4100	0.4353	0.4275	0.5265	0.6734	0.5802	0.8066	0.5440	0.7937
Replication3	0.5708	0.4535	0.5007	0.5165	0.7287	0.6247	0.5820	0.4826	0.6945
Replication4	0.4989	0.5292	0.4695	0.5628	0.8524	0.6468	0.7621	0.7085	0.5651
Replication5	0.4970	0.5359	0.5959	0.4953	0.7451	0.4791	0.5736	0.4437	0.5840
Replication6	0.3768	0.5506	0.4240	0.6558	0.6191	0.6165	0.6718	0.6305	0.5265
Mean	0.5086	0.4815	0.4877	0.5514	0.7199	0.6002	0.7010	0.6370	0.6792
SD	0.0655	0.0668	0.0664	0.0633	0.0787	0.0648	0.0870	0.1332	0.1022
% Proliferation	100.0000	94.6675	95.8910	108.4028	141.5408	117.9977	137.8106	125.2399	133.5326

ตารางที่ 6.3 : ค่า absorbance ที่ 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH12 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

Conditions	1% FBS	Tas	DZNeP	Tas +DZNeP	PDGF	PDGF +Tas	PDGF +DZNeP	PDGF+Tas +DZNeP	10% FBS
Replication1	0.3656	0.5532	0.5460	0.5960	0.9463	1.0262	0.9372	0.7826	0.6814
Replication2	0.6476	0.5269	0.5253	0.5587	1.0219	0.9522	0.9368	0.6829	0.7766
Replication3	0.6732	0.6109	0.6574	0.3033	1.0440	0.8361	0.9645	0.8050	0.8425
Replication4	0.7145	0.5171	0.5921	0.4586	0.9797	0.9038	0.9518	0.8334	0.6909
Replication5	0.5656	0.4748	0.6107	0.5688	1.0027	0.6648	1.0854	0.8209	0.7207
Replication6	0.6679	0.5953	0.5440	0.3867	1.2067	0.7506	0.8809	0.6786	0.5390
Mean	0.6538	0.5503	0.5793	0.5455	1.0336	0.8556	0.9594	0.7672	0.7085
SD	0.0549	0.0559	0.0500	0.0601	0.0913	0.1331	0.0680	0.0691	0.1025
% Proliferation	100.0000	84.1685	88.6029	83.4442	158.0932	130.8763	146.7562	117.3570	108.3757

ตารางที่ 6.4 : ค่า absorbance ที่ 620 nm จากการทดลอง cell proliferation assay ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

Conditions	1% FBS	Tas	DZNeP	Tas +DZNeP	PDGF	PDGF +Tas	PDGF +DZNeP	PDGF+Tas +DZNeP	10% FBS
Replication1	0.6155	0.7638	0.6810	0.8088	1.1088	0.8416	0.8627	0.6947	0.7768
Replication2	0.5393	0.6950	0.4406	0.6271	1.0349	0.8068	0.8564	0.6741	0.7491
Replication3	0.6062	0.7189	0.7354	0.6950	0.9073	0.7957	0.5745	0.7907	0.7716
Replication4	0.8108	0.7253	0.6374	0.6621	1.0766	0.7230	1.0323	0.8132	0.7970
Replication5	0.5672	0.7317	0.5884	0.9306	1.1971	0.8739	0.7263	0.8101	0.7803
Replication6	0.6858	0.6336	0.6582	0.5157	0.8141	0.6875	0.8659	0.8538	0.6054
Mean	0.6375	0.7114	0.6207	0.6861	1.0231	0.7881	0.8197	0.7884	0.7467
SD	0.0984	0.0441	0.1137	0.1524	0.1398	0.0707	0.1545	0.0679	0.0709
% Proliferation	100.0000	111.5954	97.3729	107.6292	160.4999	123.6274	128.5845	123.6739	117.1355

ตารางที่ 6.5 : ค่า absorbance ที่ 450 nm จากการทดลองวัดระดับ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

Orbital fibroblast	Standard		TH8		TH12		TH27	
1% FBS	1.2467	1.2068	1.4853	1.4598	1.0298	0.9498	0.8836	0.8152
Tas	0.8432	0.8359	1.7034	1.7856	1.3078	1.0858	1.0427	0.9267
DZNeP	0.5105	0.5398	1.0917	1.0936	0.9668	0.9187	0.8292	0.6731
Tas+DZNeP	0.3293	0.4289	1.5085	1.7319	1.1077	1.0389	0.7658	0.6282
PDGF+Tas	0.2351	0.2428	1.9156	1.7853	1.2465	1.0955	0.8776	0.7660
PDGF+DZNeP	0.1746	0.1670	2.0128	2.0036	1.6811	1.4391	1.1345	1.0586
PDGF+Tas+DZNeP	0.1386	0.1456	1.2924	1.4604	1.1409	1.1083	0.8000	0.8224

ตารางที่ 6.6 : ค่า absorbance ที่ 450 nm จากการทดลองวัดระดับ hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ DZNeP

Orbital fibroblast	Standard		TH8		TH12		TH27	
1% FBS	0.3959	0.4102	0.3087	0.2891	0.2788	0.2710	0.2030	0.1999
Tas	0.2657	0.3046	0.3646	0.3743	0.3411	0.3556	0.1841	0.1726
DZNeP	0.1784	0.1849	0.3416	0.3562	0.2965	0.2723	0.2189	0.2181
Tas+DZNeP	0.1178	0.1204	0.3221	0.3240	0.2619	0.2612	0.1923	0.1958
PDGF+Tas	0.0930	0.1091	0.5485	0.5408	0.4192	0.3998	0.3982	0.4566
PDGF+DZNeP	0.0916	0.0845	0.5355	0.5346	0.4463	0.4271	0.4212	0.4065
PDGF+Tas+DZNeP	0.0827	0.0894	0.4884	0.4908	0.4558	0.4230	0.3837	0.3692

ตารางที่ 6.7 : ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการทดลองวัดระดับ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ TH8 TH12 และ TH27 เมื่อใช้สารยับยั้ง Tasquinimod และ GSK591

Orbital fibroblast	Standard		TH8		TH12		TH27	
1% FBS	1.1090	1.0442	1.0522	1.0104	0.7613	0.6881	0.5949	0.5128
Tas	0.6696	0.6675	1.4200	1.3673	0.9955	0.8872	1.0000	0.8681
GSK591	0.3767	0.3747	1.3375	1.2227	0.6817	0.6674	0.5519	0.5060
Tas+ GSK591	0.2226	0.2307	1.7502	1.5776	1.1839	1.1417	1.0363	1.0740
PDGF+Tas	0.1377	0.1508	1.5528	1.3344	1.0978	1.0856	0.9069	0.8617
PDGF+ GSK591	0.0966	0.1007	1.6275	1.6992	1.3356	0.9914	1.0392	0.9424
PDGF+Tas+ GSK591	0.0738	0.0846	1.5892	1.5600	1.1404	1.1644	0.8113	0.7589