



**โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์**

**ชื่อโครงการ**

บทบาทของ Histone methyltransferase ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์  
Role of Histone methyltransferase in IGF-1 induced orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy patients

**ชื่อนิสิต**

นางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว

เลขประจำตัว 5932336423

**ภาควิชา**

จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา**

2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

บทบาทของ Histone methyltransferase ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จาก  
ดวงตาที่ถูกระตุ้นด้วย IGF-1 จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

โดย

นางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว รหัสนิสิต 5932336423

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล

ปีการศึกษา

2562

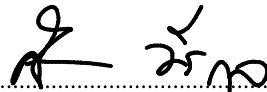
---

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

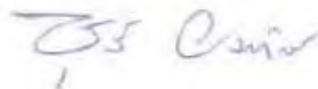
คณะกรรมการสอบโครงการ



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



..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. ชนาภัทร ปาลกะ)



..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี)

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

เรื่อง

บทบาทของ Histone methyltransferase ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

(Role of Histone methyltransferase in IGF-1 induced orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy patients)

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร. ศีตา วีรกุล

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว

รหัสประจำตัวนิสิต 5932336423

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

## โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	บทบาทของ Histone methyltransferase ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์
ชื่อนิสิต	นางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	อ.ดร.ศิตา วีรกุล

### บทคัดย่อ

โรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy; GO) เป็นโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองชนิดหนึ่ง ที่มีสาเหตุมาจากอโตแอนติบอดีไปกระตุ้นการทำงานของ Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) บนผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวน การผลิต hyaluronan และการเกิดกระบวนการ adipogenesis นอกจากนี้ยังพบ Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ในปริมาณมากใน serum ของผู้ป่วย โดยจับอย่างจำเพาะกับ IGF-1 receptor (IGF-1R) ที่แสดงออกบนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา งานวิจัยนี้ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ Histone methyltransferase ต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 โดยเมื่อทำการทดลองกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ได้รับจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ 3 คนด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase ที่เพิ่มขึ้นโดยยีน *G9a* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 2 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) และ 6 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) ยีน *DOT1L* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 2 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) และ 6 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) และยีน *EZH2* มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) ในการศึกษาผลของ IGF-1 ต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาพบว่า IGF-1 กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์(p) และการผลิต hyaluronan(p) จึงนำไปสู่การใช้สารยับยั้ง DZNeP ต่อการยับยั้งเอนไซม์ EZH2 พบว่ามีแนวโน้มลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ( $p = 0.1183$ ) นอกจากนี้การใช้สารยับยั้ง BIX01294 ต่อการยับยั้งเอนไซม์ G9a พบว่าสามารถลดค่าดูดกลืนแสงของ hyaluronan ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากผลการทดลองคาดว่ายีน *EZH2* เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ และยีน *G9a* เกี่ยวข้องกับการผลิต hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา อย่างไรก็ตามผลจากการใช้สารยับยั้งต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการผลิต hyaluronan ยังต้องมีการทดลองซ้ำเพื่อให้ได้ค่าที่มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้คงต้องมีการศึกษากลไกการเกิดโรคในเชิงลึกต่อไปเพื่อการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพสำหรับการรักษาโรคตาโปนจากไทรอยด์ในอนาคต

**Project title** Role of Histone methyltransferase in IGF-1 induced orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy patients

**Investigator** Miss Pimchanok Phankeaw

**Project advisor** Sita Virakul, Ph.D.

**Department of Microbiology Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

### ABSTRACT

Graves' ophthalmopathy (GO) is an autoimmune disease caused by Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) autoantibody which specifically bind to TSH receptor expressed on orbital fibroblasts. These processes result in orbital fibroblast proliferation, hyaluronan production and adipocyte differentiation. Moreover, previous study showed that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) increased in serum of GO patients. IGF-1 bind to IGF-1 receptor which presented on orbital fibroblasts. This study aims to investigate role of histone methyltransferase in IGF-1-induced orbital fibroblast activation. Orbital fibroblasts were obtained from 3 GO patient and stimulated by IGF-1 (100 ng/ml) for 0, 2, 4 and 6 hours. The results showed that IGF-1 induces histone methyltransferase expression which are *G9a* upregulation at 2 hours ( $p<0.001$ ) and 6 hours ( $p<0.05$ ), *DOT1L* upregulation at 2 hours ( $p<0.05$ ) and 6 hours ( $p<0.001$ ) and *EZH2* upregulation at 6 hours ( $p<0.01$ ). Moreover, IGF-1 can induce cell proliferation ( $p<$ ). To investigate the effect of Histone methyltransferase inhibitor in controlling cell proliferation, DZNeP (EZH2 inhibitor) likely decreased cell proliferation ( $p=0.1183$ ). Not only IGF-1 induces cell proliferation, but also induces hyaluronan production ( $p$ ). The results showed that BIX01294 (G9a inhibitor) significantly reduces absorbance of hyaluronan measurement ( $p<0.05$ ). Our study showed that EZH2 may control cell proliferation and G9a may involve hyaluronan production. However, results of inhibitor in controlling orbital fibroblast proliferation and hyaluronan production still need to be confirmed in order to understand the mechanism of epigenetics involved in GO which is the new approach of GO treatment.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของอาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนการช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้จากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1804/12 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สอนและให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ รวมถึงการให้ความช่วยเหลืออื่นๆ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และสมาชิกห้องปฏิบัติการ 2015 ที่ช่วยเหลือเพื่อสถานที่ในการทำงานวิจัย เพื่อให้งานเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้และตัวผู้วิจัยเอง

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ และคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนถึงผู้ดูแลโครงการ

นางสาวพิมพ์ชนก พันธุ์แก้ว

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	7
วิธีการดำเนินการทดลอง	10
ผลการทดลอง	13
อภิปรายผลการทดลอง	18
ภาคผนวก	21
เอกสารอ้างอิง	37

# บทที่ 1

## บทนำ

### โรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' hyperthyroidism) และโรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy)

โรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' hyperthyroidism) เป็นโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเอง (Autoimmune disease) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากอโตแอนติบอดีที่ผลิตในร่างกายผู้ป่วย กระตุ้น thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) ของต่อมไทรอยด์ให้ผลิตฮอร์โมนไทรอยด์ออกมามากเกินไปผิดปกติ คล้ายกับการทำงานของ thyroid-stimulating hormone (TSH) ที่หลั่งออกมาจากต่อมใต้สมอง [1,2] ผู้ป่วยโรคคอพอกแบบเป็นพิษมากกว่า 30% จะเป็นโรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' ophthalmopathy; GO) ซึ่งจะมีอาการตาโปน เปลือกตาเล็กขึ้น ผิวหนังรอบดวงตาอักเสบ เป็นต้น (รูปที่ 1) [2] โดยมีสาเหตุมาจากอโตแอนติบอดีชนิดเดียวกัน ไปกระตุ้นการทำงานของ TSHR บนผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (orbital fibroblast) [3,4] ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคตาโปนจากไทรอยด์ อีกทั้งยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันผ่านการหลั่ง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น TNF- $\alpha$  IL-6 เป็นต้น รวมถึง growth factor เช่น Platelet derived Growth Factor (PDGF) Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ที่ถูกผลิตจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย [5]

IGF-1 คือ growth factor ที่อยู่ในกลุ่มฮอร์โมนอินซูลิน โดยเป็นตัวสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึม การอยู่รอด และการเจริญของเซลล์ [6] ซึ่งจะทำงานผ่าน Insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway เป็นวิธีการส่งสัญญาณที่รักษาสสมดุลภายในเซลล์และควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยจะประกอบไปด้วย receptor 3 ชนิดได้แก่ Insulin-like growth factor-1 (IGF-1R) receptor Insulin-like growth factor-2 receptor (IGF-2R) และ Insulin receptor (INSR) ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์จะมีการส่งสัญญาณผ่านวิถี RAF/MEK/ERK [7] นอกจากนี้สามารถควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ มีงานวิจัยพบว่า IGF-1 มีมากใน serum ของผู้ป่วย [8] จึงนำไปสู่การศึกษาเพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณของ IGF-1 เพื่อเป็นการรักษาที่เฉพาะจุด (targeted therapy) สำหรับโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองหลายๆโรค เช่น โรคเนื้องอก (Neoplastic disease) โรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเอง ได้แก่ Graves' disease rheumatoid arthritis EAE และ inflammatory bowel disease เป็นต้น [9] โดยในโรคตาโปนจากไทรอยด์ IGF-1 จะจับอย่างจำเพาะกับ IGF-1 receptor (IGF-1R) ที่อยู่บนผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้และส่งผลในการกระตุ้นการสร้างสารประกอบประเภท glycosaminoglycan ชนิดไฮยาลูรอนแนน (hyaluronan ; HA) [10] ในลักษณะเดียวกันกับอโตแอนติบอดีต่อ TSHR ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) และการสังเคราะห์ hyaluronan นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า IGF-1 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ TSH receptor ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ได้ และ IGF-1R มีการทำงานร่วมกับ TSHR แบบเสริมกัน (synergistic effect) [11] ทำให้เกิดกระบวนการ Adipogenesis เปลี่ยนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์

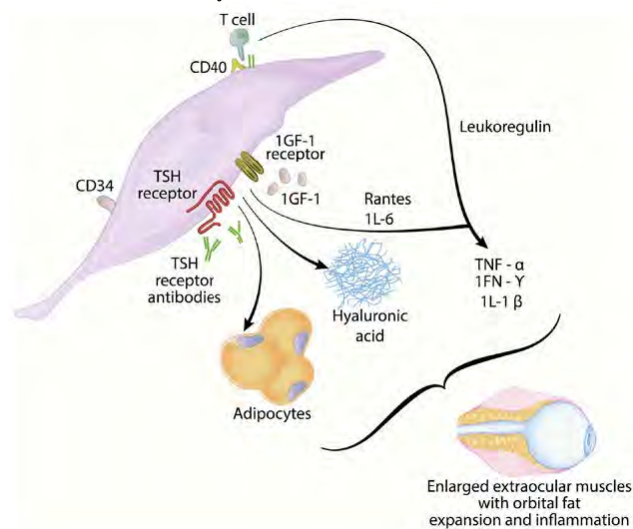


ไขมัน และการสะสม hyaluronan (รูปที่ 2) [12] ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการขยายขนาดของเนื้อเยื่อในพื้นที่จำกัด ทำให้ตามีลักษณะโปน ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษาบทบาทของ IGF-1 ในการกระตุ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

ในปัจจุบันมีการใช้รังสีรักษา การให้ยากดภูมิ และการผ่าตัดเนื้อเยื่อรอบดวงตา ซึ่งเป็นการรักษาที่มีความเสี่ยงสูง และมีผลข้างเคียง [13] โดยมีตัวอย่างการใช้ยาในกลุ่ม targeted therapy เพื่อรักษาโรคตาโปน จากไทรอยด์ เช่น infliximab และ adalimumab ที่จับกับ TNF- $\alpha$  เป็นต้น อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้ยังไม่ใช่ยาที่รักษาที่พยาธิกำเนิดของโรคทั้งหมด [14] โดยในงานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษากลไกการควบคุมเหนือยีน (Epigenetics) ของ IGF-1 ต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการสร้าง hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคใหม่ที่จำเพาะมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 1 (A) และ (B) อาการตาโปนของผู้ป่วยโรค Graves' ophthalmopathy (Rebecca S. Bahn, 2010 [3])



รูปที่ 2 บทบาทของออโตแอนติเจนบนผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ชนิด TSH receptor และ IGF-1 receptor ต่อการเกิดโรคตาโปนจากไทรอยด์ (Rebecca S. Bahn, 2015 [4])

## การควบคุมเหนือยีน (Epigenetics)

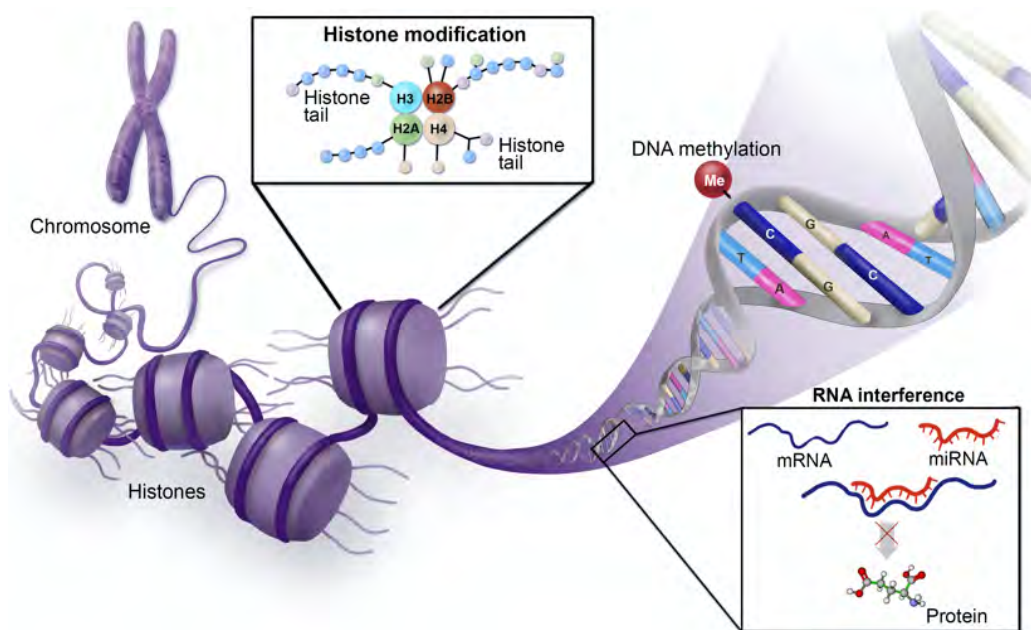
การควบคุมเหนือยีนเป็นกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ที่ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเหนือยีนสามารถควบคุมผ่าน 3 กระบวนการคือ 1.กระบวนการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) 2.กระบวนการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนบนหางโปรตีนฮิสโตน (Histone modification) 3.กระบวนการควบคุมการแปลรหัสโดย RNA interference (non-coding RNA) (รูปที่ 3)

กระบวนการ Histone modification เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบริเวณหางของโปรตีนฮิสโตนโดยการเติมหรือการลบหมู่เมทิล อะซิทิล ฟอสเฟต และอื่นๆ [15] ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับหมู่เมทิล โดยแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการคือ กระบวนการเติมหมู่เมทิล (Histone methylation) และกระบวนการดึงหมู่เมทิล (Histone demethylation) [16] โดยในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นไปที่กระบวนการเติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีนของโปรตีนฮิสโตน H3 และ H4 ผ่านเอนไซม์ Histone methyltransferase (รูปที่ 4) โดยผลของการเติมหมู่เมทิลที่ชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่ง และจำนวนหมู่เมทิลที่เติม จะส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน (กระตุ้นหรือยับยั้ง) ที่แตกต่างกันออกไป [16,17] ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอนไซม์ทั้งหมด 6 ชนิดคือเอนไซม์ Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) และเอนไซม์ Enhancer of zeste homolog 1 (EZH1) ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลบนตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีนที่ 27 ของหางโปรตีนฮิสโตน 3 และเอนไซม์ Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase (EHMT2) หรือ G9a ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนไลซีนที่ 9 ที่หางโปรตีนฮิสโตน 3 โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ควบคุมการแสดงออกในทำนองเดียวกัน คือกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อเติมหมู่เมทิล 1 หมู่ ในทางกลับกัน เมื่อเติมหมู่เมทิล 2 หรือ 3 หมู่บนตำแหน่งดังกล่าว จะยับยั้งการแสดงออกของยีน เอนไซม์อีก 3 ชนิดได้แก่เอนไซม์ DOT1 Like HistoneLysine Methyltransferase เติมหมู่เมทิล 3 หมู่ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีนที่ 79 หางโปรตีนฮิสโตน 3 สามารถกระตุ้นและยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ SET Domain Containing 7 (SETD7) เติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนไลซีนที่ 20 หางโปรตีนฮิสโตน 4 จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อเติมหมู่เมทิล 1 หมู่ และยับยั้งการแสดงออกของยีนเมื่อเติมหมู่เมทิล 3 หมู่ และเอนไซม์ Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) เติมหมู่เมทิลที่กรดอะมิโนอาร์จินีนที่ 8 หางโปรตีนฮิสโตน 3 [17]

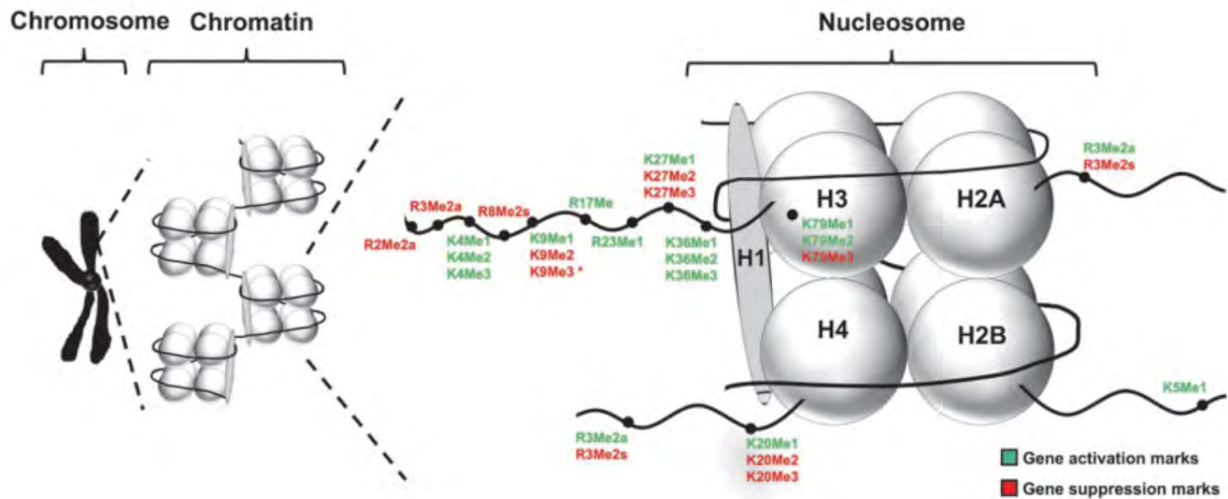
มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการแสดงของออกยีน *EZH2* ต่อการเกิดโรคหนังแข็ง (Sclerosis) เมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *EZH2* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของผู้ป่วยโดยการให้สารยับยั้ง DZNeP ส่งผลให้คอลลาเจน การแสดงออกของยีน *TGF-β* ที่ถอดรหัสได้เป็น growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนัง รวมถึงยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับเกิดโรคหนังแข็งลดลง [18] อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ G9a ต่อการควบคุมการเกิดโรคพังผืดในปอด (Pulmonary fibrosis) ผ่านวิถี *TGF-β* [19] ในส่วนของงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ DOT1L ส่งผลต่อการลดการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไต ที่กระตุ้นด้วย *TGF-β* โดยจะลดการแสดงออกและ phosphorylation ของ Epidermal growth factor receptor (EGFR) และ Platelet-derived growth

factor receptor (PDGFR) และเพิ่มการแสดงออกของ Notch1 ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยที่ได้กล่าวมาเกี่ยวข้องกับการเกิด fibrosis ในไต [20] นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ SET7/9 ต่อการรักษาโรค peritoneal fibrosis โดยลดการผลิตคอลลาเจนและ extracellular matrix [21] จะเห็นได้ว่า ยีน HMT เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืด (fibrosis) ในส่วนของเอนไซม์ EZH1 และ PRMT5 ยังไม่มีการศึกษาในโรค fibrosis อย่างไรก็ตามในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในโรคตาโปนจากไทรอยด์ยังไม่มีรายงานของกระบวนการนี้

จากการค้นคว้าข้อมูลดังกล่าว จึงนำมาสู่การศึกษาทบทวนของ IGF-1 ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาและการผลิต HA ผ่านกระบวนการเติมหมู่เมทิลบนหางโปรตีนฮิสโตน (Histone methylation) โดยการศึกษาการแสดงออกของยีน HMT ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 และมีการใช้ Histone methyltransferase inhibitors (HMTi) 8 ชนิดต่อการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์แสดงในตารางที่ 4 การศึกษาการยับยั้งการควบคุมเหนือยีนดังกล่าว อาจนำไปสู่การค้นพบแนวทางใหม่ของการรักษาโรคตาโปนจากไทรอยด์ต่อไปได้



รูปที่ 3 กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเหนือยีน (American Society of Hematology, 2017)



รูปที่ 4 โครงสร้างโปรตีนฮิสโตนและการควบคุมการแสดงออกแบบเหนือยีนของตำแหน่งกรดอะมิโนต่างๆและจำนวนหมู่เมทิล (Me) ที่แตกต่างกันบนกรดอะมิโนบนหางโปรตีนฮิสโตน H3 และ H4 (Christina Y. Lee, Patrick Grant, 2019) [15]

ตารางที่ 1 กลไกของเอนไซม์ Histone methyltransferase ชนิดต่างๆที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลตามจำนวนหมู่เมทิล และตำแหน่งบนหางโปรตีนฮิสโตน (Araki Y, Mimura T1, 2017) [16]

Histone and residues	States of methylation			HMTs
	me1	me2	me3	
<b>Lysine</b>	me1	me2	me3	
<b>H3K4</b>	A	A	A	SET7/9
<b>H3K9</b>	A	R	R	G9a
<b>H3K27</b>	A	R	R	EZH1, EZH2
<b>H3K79</b>	-	-	A or R	DOT1L
<b>Arginine</b>	me1	me2a	me2s	
<b>H4R3</b>	-	A	-	PRMT5

A หมายถึงมีการถอดรหัสของยีนได้ และ R หมายถึงยับยั้งการแสดงออกของยีน

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ก. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Histone methyltransferase ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1
- ข. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้ง Histone methyltransferase ต่อการลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การผลิต IL-6 และ hyaluronan ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ก. ได้ฝึกฝนการเพาะเลี้ยงเซลล์
- ข. พัฒนาระบบการคิดวิเคราะห์ผลการทดลองแบบวิทยาศาสตร์
- ค. สามารถนำผลการทดลองต่อยอดสำหรับการรักษาโรคตาไปนจากไทรอยด์

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

#### 2.1 อุปกรณ์

-ตู้บ่มเซลล์ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% รุ่น New Brunswick Galaxy 170s incubator ของบริษัท eppendorf ประเทศเยอรมัน

-ตู้ปลอดเชื้อ biological safety cabinets ของบริษัท แล็บ ไมโคร จากัด ประเทศไทย

-กล้องจุลทรรศน์ รุ่น OLYMPUS CKX3-SLP ของบริษัท OLYMPUS ประเทศญี่ปุ่น

-อ่างควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

-เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5804 R ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน

-เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร รุ่น 5424 ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน

-เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 ของบริษัท Biochrom Ltd. ประเทศอังกฤษ

-เครื่องผสมสาร รุ่น G560E Vortex Mixer Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

-ฮีมาไซโตมิเตอร์ ของบริษัท ISOLAB Laborgerate GmbH ประเทศเยอรมัน

-ขวดดูแรน ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร SCHOTT DURAN® ของบริษัท Duran group ประเทศเยอรมัน

-พลาสติกเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรอง Nunc™ EasYFlask ขนาด 75 และ 175 ตารางเซนติเมตร ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศจีน

-ไมโครเพลท 6 หลุม 12 หลุม และ 96 หลุม cell culture plate Nunclon™ Delta Surface ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศจีน

-หลอดเซนติฟิวจ์พลาสติก ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศเกาหลี

-หลอดไมโครเซนติพีพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

-หลอด cryovial ของบริษัท SPL Life Sciences ประเทศเกาหลี

-เซอร์โวลิจิคัลปิเปตต์ ขนาด 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศเกาหลี

-ไมโครปิเปตต์ ขนาด P10, P100, P200, P1000 ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน

-ไมโครปิเปตต์ ทิป แบบมีตัวกรองและไม่มีตัวกรอง ขนาด 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

-เครื่อง Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

-Eppendorf ThermoMixer C ของบริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน

## 2.2 เคมีภัณฑ์

-อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / High Glucose ของบริษัท Hyclone™ ประเทศสหรัฐอเมริกา

-ฟีตัลโบไวน์ซีรัม (Fetal Bovine serum; FBS) ของบริษัท Gibco™ Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

-ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ของบริษัท Gibco™ Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

-0.25% ทริปซิน/อีดีทีเอ (Trypsin/EDTA) ของบริษัท Gibco™ Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา -tri-Potassium citrate monohydrate; K<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) • H<sub>2</sub>O ของบริษัท Sigma-Aldrich® ประเทศสหรัฐอเมริกา

-สีย้อมทริปแฟนบลู 0.4% (Trypan blue) ของบริษัท Gibco™ Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

-โปรตีนรีคอมบิแนนท์อินซูลินไลค์โกรทแฟคเตอร์-1 ของมนุษย์ (Insulin-like growth factor 1; IGF-1) ของบริษัท BioLegend ประเทศสหรัฐอเมริกา

-HMT inhibitor ของบริษัท Selleck chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา

-HMT probe และ primer ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

-Phosphate-buffered saline (PBS) ของบริษัท Life technologies ประเทศเยอรมัน

### 2.3 Molecular reagent

-Taqman™ Reverse Transcription reagent ของบริษัท Applied biosystem ประเทศสหรัฐอเมริกา

-SSoAdvance™ Universal Probes super mix ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 2.4 ชุด ELISA

- Hyaluronan DuoSet ELISA ของบริษัท R&D system Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

- IL-6 ELISA MAX Deluxe ของบริษัท Biolegend ประเทศสหรัฐอเมริกา



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการทดลอง

#### 1. เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 ตารางเซนติเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ complete growth media Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ผสมกับ FBS [10%(vol/vol)] และยาปฏิชีวนะ Gentamicin แล้วบ่มในสภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin/EDTA

**ตารางที่ 2** ระบุข้อมูลของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อบริเวณรอบดวงตา (orbital tissue) ของผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

Orbital fibroblast	CAS score	Gender	Passage
I_GO_TH8	1/7	Male	5-12
I_GO_TH12	0/7	Female	4-12
I_GO_TH27	0/7	Male	4-12

#### 2. การศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม HMT ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อกระตุ้นด้วย IGF-1

##### 2.1 การกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

ใช้ไมโครเพลต 6 หลุม โดยให้แต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์ประมาณ 400,000 เซลล์ จากนั้นทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย IGF-1 (BioLegend, San Diego, California, USA) ความเข้มข้น 100ng/mL เป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

##### 2.2 การสกัด RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

Rneasy MiniKit (QIAGEN, Austin, Texas, USA) จากนั้นจะใช้ RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม เพื่อทำการเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย Taqman™ Reverse Transcription Reagents (Applied biosystems, California, USA)

##### 2.3 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase

ด้วยวิธี real-time PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad, Hercules, California, USA) โดยใช้ SSoAdvance™ Universal Probes super mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) และยีนควบคุม *ABL* โดยใช้ primer-probe ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 primer และ probe ที่ใช้ใน real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probes (5'-3')
<i>ABL</i>	TGGAGATAACATCTAAGC ATAACTAAAGGT	GATGTAGTTGCTTGGGA CCCA	CCATTTTTGGTTTGGGCTTC ACACCATT
<i>G9a</i>	hs01053846_m1 (Thermo Fisher Scientific)		
<i>DOT1L</i>	hs01579928_m1 (Thermo Fisher Scientific)		
<i>EZH1</i>	hs00157470_m1 (Thermo Fisher Scientific)		
<i>EZH2</i>	hs00544830_m1 (Thermo Fisher Scientific)		
<i>SETD7</i>	hs00363902_m1 (Thermo Fisher Scientific)		
<i>PRMT5</i>	hs01047356_m1 (Thermo Fisher Scientific)		

### 3. การทดสอบสภาวะป้องกันโรคของสารยับยั้ง HMTi ในการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ใช้ไมโครเพลต 96 หลุม โดยให้แต่ละหลุมมีเซลล์ 6,000 เซลล์ ในการทดสอบสภาวะป้องกันโรคจะทดสอบประสิทธิภาพของตัวยับยั้ง HMTi ทั้ง 8 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้น 2 เท่าและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จากงานวิจัยก่อนหน้า [22] บ่มรวมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วย IGF-1 (BioLegend, San Diego, California, USA) ความเข้มข้น 100mg/mL เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์โดยใช้ 1% methylene blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) และวัด absorbance ที่ 620 nm โดยใช้ microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

ตารางที่ 4 แสดงตัวยับยั้งเหนี่ยวนำ HMTi ทั้ง 8 ชนิดกับยีนเป้าหมายและตำแหน่งกรดอะมิโนบนหางโปรตีนฮิสโตน [22]

HMT inhibitors	Target gene	Target location	Concentration (uM)
DZNeP	EZH2	H3K27	12
BIX01294	G9a	H3K9	10.8
Pinometostat	DOT1L	H3K79	9
SGC707	PRMT3	H4R3	6.4

UNC0379	SETD8	H4K20	31.6
CPI360	EZH1	H3K27	6
PFI-2HCl	SETD7	H3K4	8
GSK591	PRMT5	H3R8/H4R3	10

4. ทดสอบการผลิตไฮยาลูรอนแนนและ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะรักษาโรค  
ใช้ไมโครเพลต 12 หลุม โดยให้แต่ละหลุมมีเซลล์ประมาณ 100,000 เซลล์ มาบ่มรวมกับตัวกระตุ้นเซลล์  
IGF-1 และ HMTi เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำ ELISA เพื่อทดสอบการผลิตไฮยาลูรอนแนน  
โดย Hyaluronan DuoSet ELISA (R&D system Inc., MN, USA) และทดสอบการผลิต IL-6 โดย Human  
IL-6 ELISA MAX Deluxe (Biolegend, San Diego, CA, USA) แล้ววัดค่า optical density ที่ 450 nm โดย  
ใช้ microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

5. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ paired t-test โดยมี  $p < 0.05$

ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ paired t-test เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมผลลบ วิเคราะห์ทาง  
สถิติแบบ Spearman's correlation การแสดงผลการทดลอง ให้แต่ละจุดแทนแต่ละเซลล์ของคนไข้ และ  
พิจารณาผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ \* แทน  $p < 0.05$  \*\* แทน  $p < 0.01$  และ  
\*\*\* แทน  $p < 0.001$

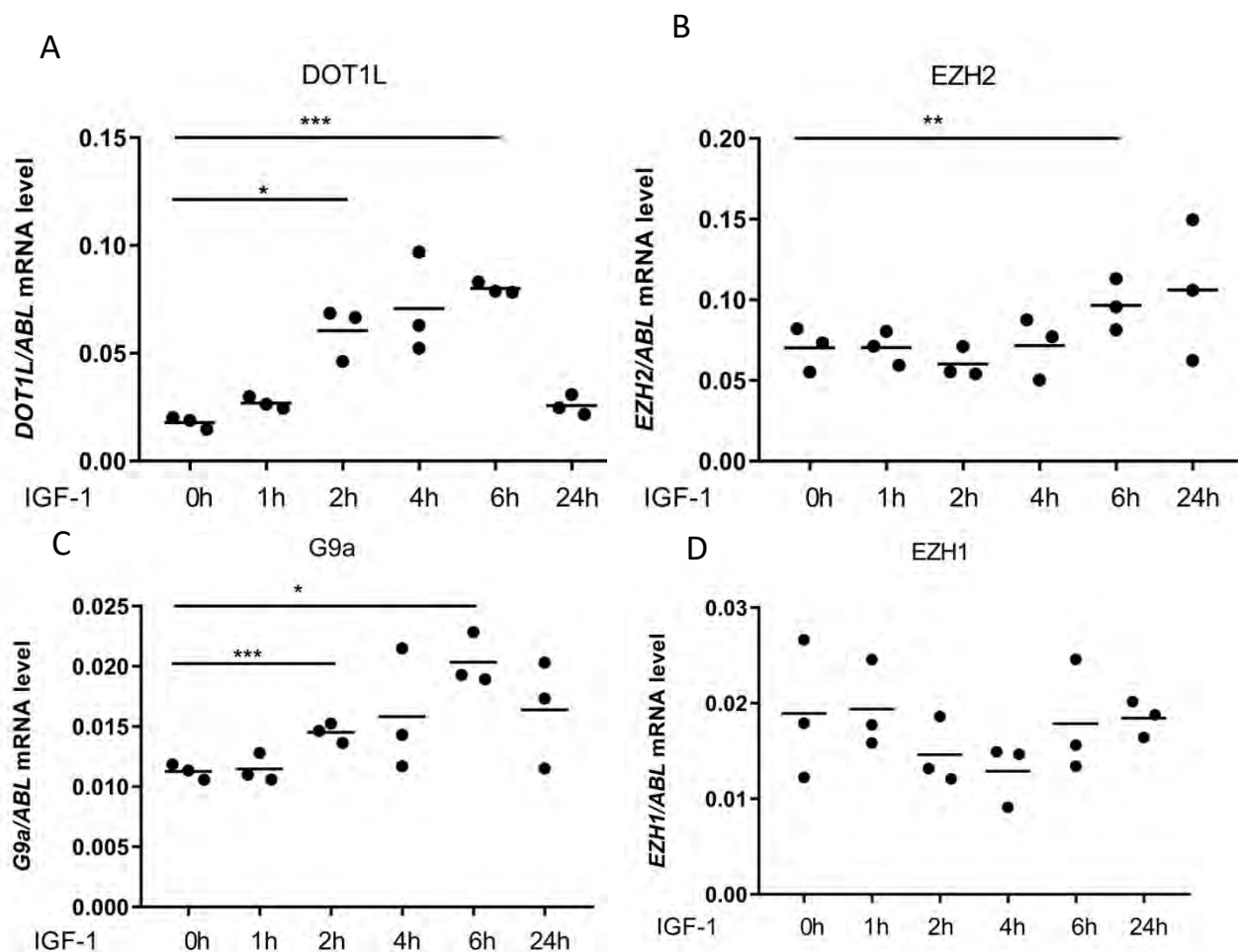
## บทที่ 4

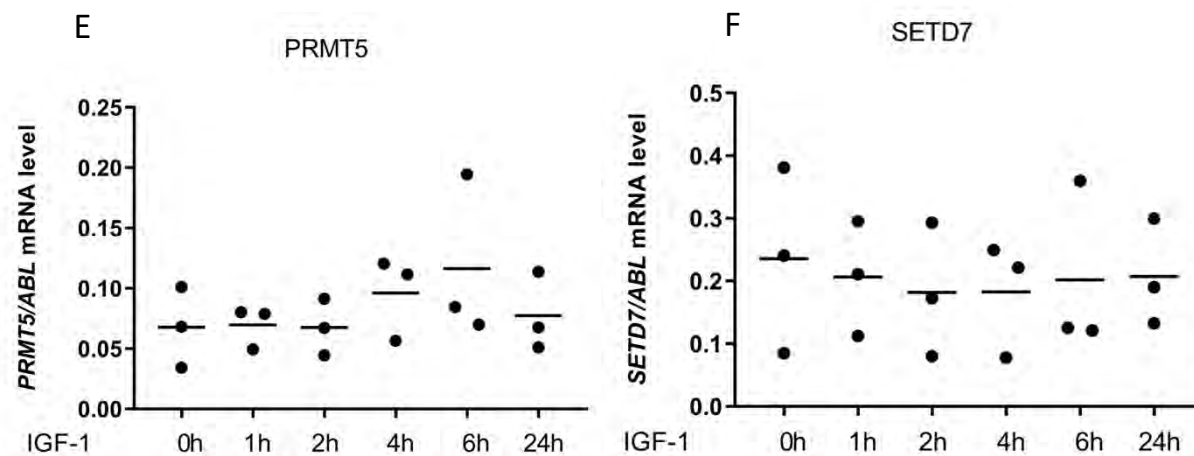
### ผลการทดลอง

#### 1. ผลของการกระตุ้น IGF-1 ต่อการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase ในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตา

จากการทดลองการวัดระดับการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase เมื่อใช้ IGF-1 ในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตาจำนวนทั้งหมด 3 คนใช้ เป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 6, 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR พบว่า

ยีน *DOT1L* สามารถแสดงออกได้เพิ่มขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 ที่เวลา 2 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) และ 6 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 1A) ยีน *EZH2* สามารถแสดงออกได้เพิ่มขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 ที่เวลา 6 ชั่วโมง ( $p < 0.01$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 1B) ยีน *G9a* สามารถแสดงออกได้เพิ่มขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 ที่เวลา 2 ชั่วโมง ( $p < 0.001$ ) และ 6 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูป 1C) ในขณะที่ยีน *EZH1* *PRMT5* และ *SETD7* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (รูป 1D-1F)





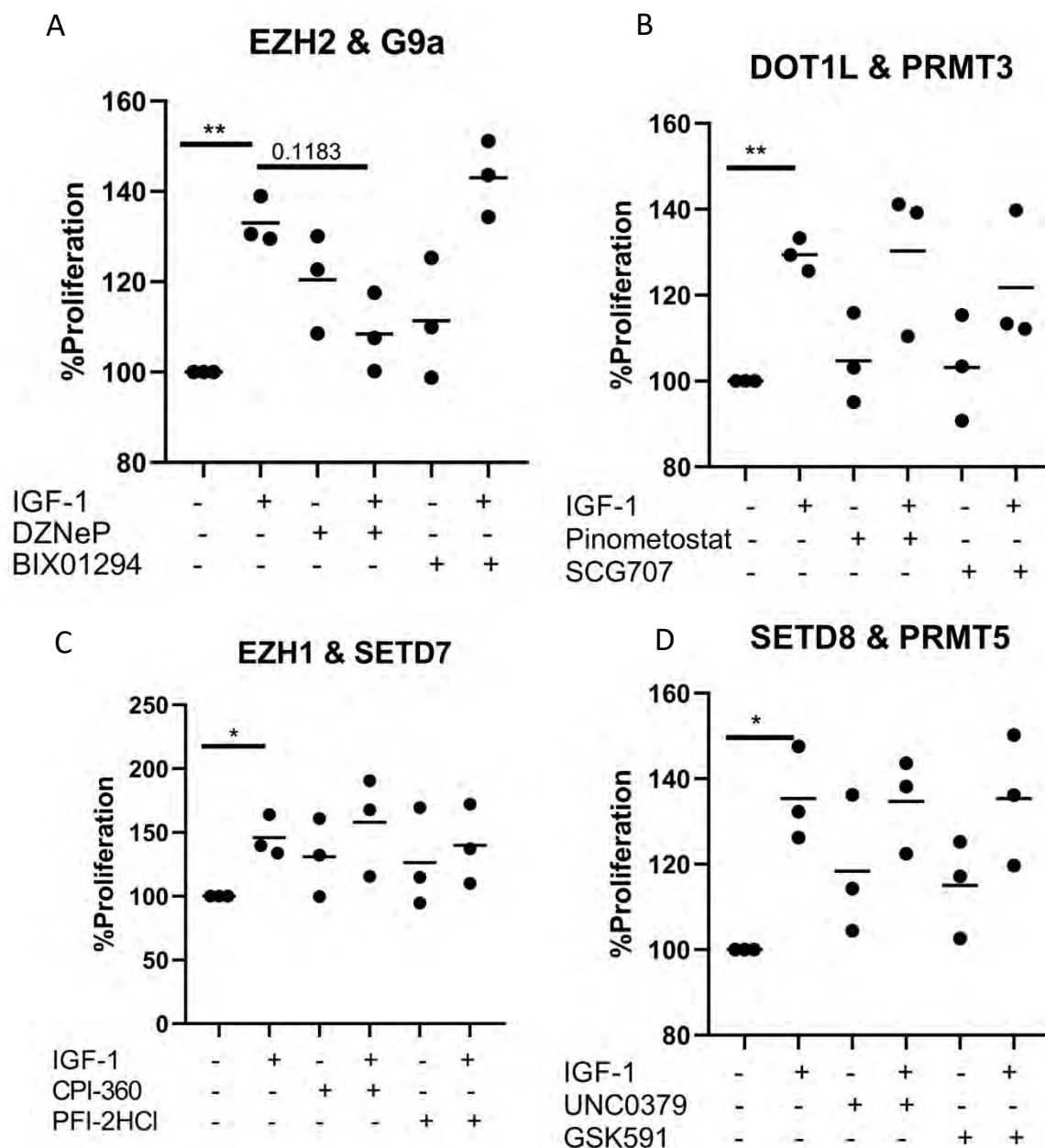
รูปที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase (n=3) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100 ng/ml) เป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 6, 24 ชั่วโมง (A) กราฟแสดงการแสดงออกของยีน *DOT1L* (B) *EZH2* (C) *G9a* (D) *EZH1* (E) *PRMT5* (F) *SETD7*

## 2. ผลของสารยับยั้ง Histone methyltransferase ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

จากผลการทดลองการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจำนวนทั้งหมด 3 คนไข้ (n=3) พบว่าการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย IGF-1 ทำให้มีเซลล์มีจำนวนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูป 2A-2D)

การใช้สารยับยั้ง DZNeP BIX01294 (รูป 2A) CPI360 PFI-2HCl (รูป 2C) UNC0379 และ GSK591 (รูป 2D) ไม่ร่วมกับการกระตุ้นด้วย IGF-1 มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่การใช้สารยับยั้ง Pinometostat และ SGC707 ไม่เพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

เมื่อใช้สารยับยั้ง DZNeP ร่วมกับการกระตุ้นเซลล์ด้วย IGF-1 (รูป 2A) มีแนวโน้มในการลดจำนวนเซลล์ ( $p = 0.1183$ ) ในทางกลับกัน การใช้สารยับยั้ง BIX01294 (รูป 2A) Pinometostat SGC707 (รูป 2B) CPI-360 PFI-2HCl (รูป 2C) UNC0379 และ GSK591 (รูป 2D) ไม่สามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1



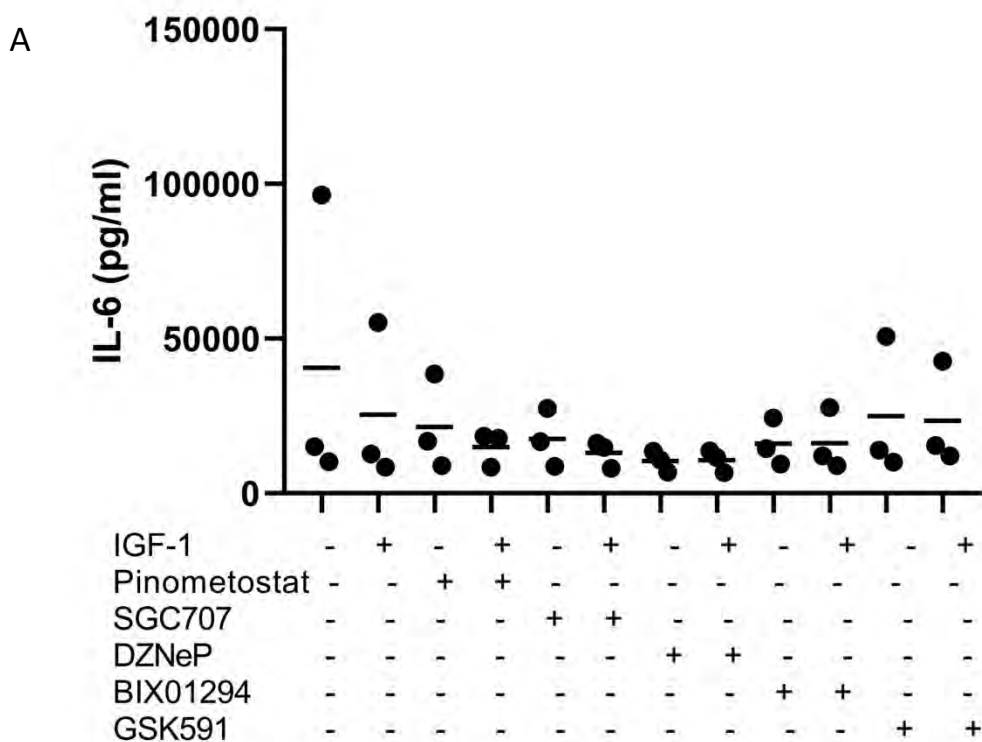
รูปที่ 2 ผลของสารยับยั้ง (Histone methyltransferase inhibitor; HMTi) ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นกระตุ้นด้วย IGF-1 (100 ng/ml) ทำการย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue (A) ระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อใช้ DZNeP ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ EZH2 และ BIX01294 ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ G9a (B) ระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อใช้ pinometostat ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ DOT1L และ SGC707 ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ PRMT3 (C) ระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อใช้ CPI-360 ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ EZH1 และ PFI-2HCl ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ SETD7 (D)

ระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเมื่อใช้ UNC0379 ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ SETD8 และ GSK591 ที่ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ PRMT

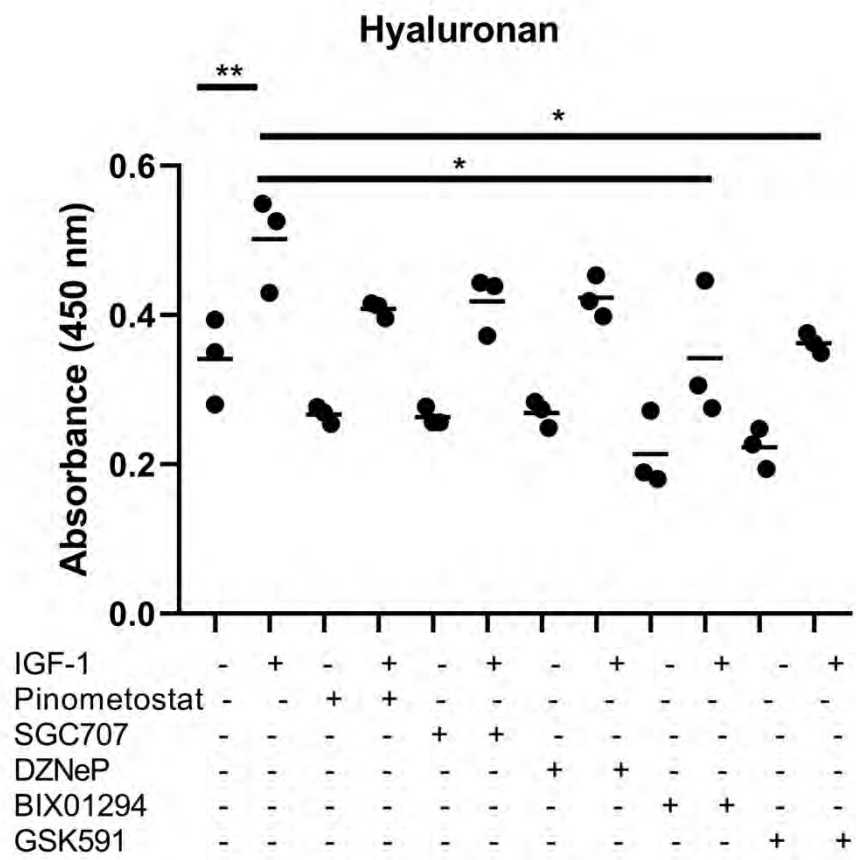
### 3. ผลของสารยับยั้ง Histone Methyltransferase ต่อการผลิต IL-6 และ hyaluronan (HA)

เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาทั้ง 3 คนไข้ (n=3) ด้วย IGF-1 ไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการผลิต IL-6 จึงไม่สามารถแปลผลของการใช้สารยับยั้งได้ (รูป 3A)

จากผลการทดลองเบื้องต้น ค่าดูดกลืนแสงแสดงให้เห็นว่า IGF-1 กระตุ้นการสร้าง hyaluronan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (รูป 3B) โดยผลของสารยับยั้ง (HMTi) ทั้ง 5 ชนิดได้แก่ DZNeP BIX01294 Pinometostat SCG707 และ GSK591 ลดการผลิต hyaluronan เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย IGF-1 เมื่อใช้สารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดร่วมกับการกระตุ้นด้วย IGF-1 ส่งผลต่อการลดการผลิต hyaluronan ทุกชนิด โดยเฉพาะ สารยับยั้ง BIX01294 และ GSK591 ที่ลดการสร้าง hyaluronan ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูป 3B)



B



**รูปที่ 3** ผลของ IL-6 และการสร้าง hyaluronan เมื่อกระตุ้นด้วย IGF-1 (100 ng/mg) และการใช้สารยับยั้ง (HMTi) (A) ปริมาณ IL-6 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (B) ค่า OD ของ hyaluronan ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา



## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

#### อภิปรายผลการทดลอง

IGF-1 กระตุ้นการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา โดยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการผลิต hyaluronan ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคตาโปนจากไทรอยด์ (GO) ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเอนไซม์ histone methyltransferase มีความเกี่ยวข้องกับผลจากการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย IGF-1 ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการการผลิต hyaluronan ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลของ IGF-1 ต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาและการผลิต hyaluronan [10] นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของ IGF-1 ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ  $\alpha$ -SMA การผลิตคอลลาเจน และการแสดงออกของ TGF- $\beta$  ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากปอด [23] และ IGF-1 สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ และช่วยรักษาสมดุลของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังต่อการควบคุมความชราของผิวหนัง [24]

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาถึงผลของ IGF-1 ต่อการควบคุมเหนือยีน (Epigenetics) โดยมุ่งเป้าไปที่กระบวนการ histone methyltransferase ต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ EZH2, DOT1L และ G9a เกี่ยวข้องกับผลของ IGF-1 ในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา โดยที่ *DOT1L* และ *G9a* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย IGF-1 ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ในขณะที่ *EZH2* มีการแสดงออกที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR ซึ่งศึกษาในระดับ mRNA เพียงเท่านั้น ควรศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนควบคู่ไปกับการศึกษาในระดับยีน เนื่องจากในการแสดงออกระดับโปรตีน อาจจะมีการควบคุมการแสดงออกผ่านกระบวนการอื่น เช่น DNA methylation และ RNA interference

ผลการใช้สารยับยั้งต่อเอนไซม์ พบว่าการยับยั้งเอนไซม์ EZH2 โดยสารยับยั้ง DZNeP มีแนวโน้มลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งตรงกับผลจากงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงผลของสารยับยั้ง DZNeP ต่อการลดการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง H3K27 และยับยั้งเอนไซม์ EZH2 ในการลดจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไตและลดอาการ renal fibrosis [25] ในขณะที่การยับยั้ง G9a โดยใช้สารยับยั้ง BIX01294 ไม่สามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในงานวิจัยนี้ ซึ่งได้ผลไม่ตรงกับงานวิจัยที่ใช้สารยับยั้ง BIX01294 ในการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไตและการแสดงออกของ  $\alpha$ -SMA [26] นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ pinometostat ต่อการยับยั้งเอนไซม์ DOT1Lในงานวิจัยนี้ ไม่ส่งผลต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา โดยผลที่ได้ไม่ตรงกับงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ DOT1L ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไต และอาการ kidney fibrosis [27] อย่างไรก็ตาม เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน และชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน มีลักษณะและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน นำไปสู่ผลการยับยั้งที่ไม่ตรงกัน จากผลการทดลองจึงอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ EZH2 เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา โดยบทบาทของเอนไซม์ EZH2 ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จะเป็น co-activator สำหรับ transcription factor TCF/ $\beta$ -catenin และ Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) complex ในการกระตุ้นการเกิด

transcription [28] ทั้งนี้การใช้สารยับยั้งเอนไซม์มีโอกาสเกิดการยับยั้งแบบ off-target จึงควรศึกษาบทบาทของเอนไซม์ในการยับยั้งผลของเอนไซม์โดยลดการทำงานของเอนไซม์ (knockdown) เช่น การใช้ siRNA เปรียบเทียบกับผลของสารยับยั้ง

จากผลการทดลองในรูปที่ 3A ศึกษาการผลิต IL-6 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 พบว่า IGF-1 ไม่กระตุ้นการผลิต IL-6 ซึ่งไม่พบรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการกระตุ้นของ IGF-1 ต่อปริมาณของ IL-6 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ดังนั้นในการศึกษาผลของสารยับยั้งต่อการผลิต cytokine จึงควรศึกษา cytokine ชนิดอื่น เช่น IL-16 และ RANTES โดยมีรายงานศึกษาบทบาทของ IGF-1 receptor (IGF-1R) บนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์ พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย IGF-1 และ autoantibody ต่อ IGF-1R จะกระตุ้นการผลิต IL-16 และ Chemokine ligand 5 (CCL5 หรือ RANTES) [29]

จากผลการทดลองในรูป 3B ศึกษาผลของ IGF-1 ต่อการกระตุ้นการผลิต hyaluronan พบว่า IGF-1 สามารถกระตุ้นการผลิต hyaluronan ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากงานวิจัยที่ศึกษาการผลิต hyaluronan จากการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย IGF-1 และ PDGF-BB [30] จึงนำไปสู่การใช้สารยับยั้ง (HMTi) ต่อการผลิต hyaluronan ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา พบว่าจากการทดลองเบื้องต้น สารยับยั้งที่สามารถลดค่าดูดกลืนแสงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ BIX01294 (สารยับยั้งเอนไซม์ G9a) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลของสารยับยั้ง BIX01294 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่กระตุ้นด้วย PDGF-BB ต่อการยับยั้งการผลิต hyaluronan [22] ซึ่งกล่าวได้ว่ามีเพียงเอนไซม์ G9a เกี่ยวข้องกับการผลิต hyaluronan ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา เนื่องจากสารยับยั้ง GSK591 (ยับยั้งเอนไซม์ PRMT5) ที่สามารถลดค่าดูดกลืนแสงได้ แต่ IGF-1 ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน PRMT5 อย่างไรก็ตามผลการวัดการผลิต hyaluronan ในงานวิจัยนี้แสดงผลของการวัดค่าดูดกลืนแสง hyaluronan เป็นผลที่บอกเพียงแนวโน้มของ hyaluronan จึงควรมีการทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลของปริมาณ hyaluronan ด้วยค่าทางสถิติ

จากผลการทดลองที่พบว่า IGF-1 สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการผลิต hyaluronan ในงานวิจัยนี้มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปสู่การรักษาโรคตาโปนจากไทรอยด์โดยมุ่งเน้นไปที่การรักษาที่พยาธิกำเนิดโดยตรง เช่นการใช้ Teprotumumab ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ IGF-1R และอยู่ใน clinical trial phase 3 [31] อย่างไรก็ตามการใช้สารยับยั้ง (HMTi) เพื่อหาปัจจัยทาง epigenetics ที่เกี่ยวข้องกับการกำเนิดโรค ทั้งนี้ควรมีการศึกษากระบวนการอื่นควบคู่ไปด้วย เช่น Histone acetylation และ Histone deacetylation เป็นต้น นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาเพียง 3 คนใช้ จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดลองซ้ำ และเพิ่มตัวอย่างเซลล์เพื่อยืนยันผลด้วยค่าทางสถิติที่มีความน่าเชื่อถือ

## สรุปผลการทดลอง

การกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย IGF-1 ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา และการผลิต hyaluronan แต่ไม่กระตุ้นการผลิต IL-6 นอกจากนี้ IGF-1 กระตุ้นการเพิ่มการแสดงออกของยีน Histone methyltransferase (HMT) ได้แก่ *EZH2* *G9a* และ *DOT1L* เมื่อใช้สารยับยั้ง DZNeP มีแนวโน้มที่จะสามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ สามารถกล่าวได้ว่ายีน *EZH2* เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การใช้สารยับยั้ง BIX01294 สามารถลดการผลิต hyaluronan ได้ ซึ่งกล่าวได้ว่ายีน *G9a* เกี่ยวข้องกับการผลิต hyaluronan

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
ไดโซไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1.44 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.24 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

\*ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
  
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 IGF-1 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

IGF-1	2.09 มิลลิลิตร
สารละลาย 1% BSA	7.942 มิลลิลิตร

\*ละลายสาร IGF-1 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ 1% BSA จากนั้นกรองด้วยตัวกรอง  
ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

## ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 5 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ *G9a* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

sample	ABL	mean	G9a	mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28	24.306	30.83	30.768	-6.461875012	0.011344407
	24.33		30.70			
TH8 1h	24.40	24.459	30.69	30.747	-6.28787135	0.01279859
	24.52		30.80			
TH8 2h	24.26	24.338	30.42	30.432	-6.093819712	0.014641227
	24.41		30.44			
TH8 4h	24.30	24.275	30.40	30.402	-6.127333135	0.014305035
	24.25		30.41			
TH8 6h	24.63	24.58	30.33	30.304	-5.723752733	0.01892251
	24.53		30.28			
TH8 24h	24.40	24.453	30.33	30.304	-5.851139119	0.017323339
	24.51		30.28			
TH12 0h	24.29	24.308	30.74	30.706	-6.39872643	0.011851994
	24.33		30.67			
TH12 1h	24.39	24.435	31.02	30.944	-6.508947161	0.010980236
	24.48		30.86			
TH12 2h	24.35	24.337	30.41	30.373	-6.035244875	0.015247908
	24.33		30.34			
TH12 4h	25.05	25.131	30.71	30.671	-5.540392434	0.021486995
	25.21		30.63			
TH12 6h	25.24	25.274	30.76	30.726	-5.452631665	0.022834648
	25.31		30.69			
TH12 24h	25.29	25.275	30.52	30.897	-5.62157583	0.020311269
	25.26		31.27			
TH27 0h	24.95	24.952	31.50	31.515	-6.562495528	0.010580154
	24.96		31.53			
TH27 1h	25.10	25.148	31.57	31.708	-6.56013841	0.010597455
	25.20		31.85			
TH27 2h	25.22	25.228	31.46	31.425	-6.196799421	0.013632562
	25.24		31.39			
TH27 4h	25.75	25.797	32.05	32.214	-6.417221186	0.011701026
	25.85		32.38			
TH27 6h	26.39	26.361	32.06	32.058	-5.697150668	0.019274661
	26.33		32.06			
TH27 24h	25.81	25.865	32.19	32.306	-6.44030877	0.011515263
	25.92		32.42			

ตารางที่ 6 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ *EZH2* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

sample	ABL	mean	EZH2	mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28	24.306	28.05	28.07719	-3.770916	0.0733
	24.33		28.11			
TH8 1h	24.40	24.459	28.17	28.09546	-3.636547	0.0804
	24.52		28.02			
TH8 2h	24.26	24.338	28.25	28.15246	-3.814474	0.0711
	24.41		28.06			
TH8 4h	24.30	24.275	27.71	27.78664	-3.512124	0.0876
	24.25		27.87			
TH8 6h	24.63	24.58	28.03	27.96865	-3.388201	0.0955
	24.53		27.91			
TH8 24h	24.40	24.453	27.93	27.69117	-3.237901	0.106
	24.51		27.45			
TH12 0h	24.29	24.308	28.11	27.91471	-3.606993	0.0821
	24.33		27.72			
TH12 1h	24.39	24.435	28.33	28.24566	-3.810836	0.0713
	24.48		28.16			
TH12 2h	24.35	24.337	28.51	28.51138	-4.1739	0.0554
	24.33		28.52			
TH12 4h	25.05	25.131	28.84	28.82837	-3.697384	0.0771
	25.21		28.81			
TH12 6h	25.24	25.274	28.42	28.4189	-3.145371	0.113
	25.31		28.42			
TH12 24h	25.29	25.275	28.07	28.01552	-2.740225	0.1497
	25.26		27.96			
TH27 0h	24.95	24.952	29.07	29.13043	-4.178214	0.0552
	24.96		29.19			
TH27 1h	25.10	25.148	29.23	29.2229	-4.074555	0.0594
	25.20		29.21			
TH27 2h	25.22	25.228	29.44	29.43472	-4.206549	0.0542
	25.24		29.43			
TH27 4h	25.75	25.797	30.15	30.11167	-4.314749	0.0502
	25.85		30.07			
TH27 6h	26.39	26.361	30.06	29.97949	-3.618445	0.0814
	26.33		29.89			
TH27 24h	25.81	25.865	29.94	29.8666	-4.001101	0.0625
	25.92		29.79			

ตารางที่ 7 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ *EZH1* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

	ABL	mean	EZH1	mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28	24.31	30.10	30.11	-5.80	0.0179140
	24.33		30.12			
TH8 1h	24.40	24.46	30.31	30.28	-5.82	0.0177293
	24.52		30.24			
TH8 2h	24.26	24.34	30.63	30.58	-6.25	0.0131586
	24.41		30.54			
TH8 4h	24.30	24.27	30.38	30.34	-6.07	0.0149154
	24.25		30.30			
TH8 6h	24.63	24.58	30.76	30.80	-6.22	0.0134097
	24.53		30.85			
TH8 24h	24.40	24.45	30.22	30.19	-5.73	0.0187780
	24.51		30.16			
TH12 0h	24.29	24.31	29.63	29.54	-5.23	0.0266311
	24.33		29.45			
TH12 1h	24.39	24.43	29.66	29.78	-5.35	0.0245690
	24.48		29.91			
TH12 2h	24.35	24.34	30.10	30.09	-5.75	0.0186040
	24.33		30.07			
TH12 4h	25.05	25.13	31.22	31.22	-6.09	0.0146722
	25.21		31.23			
TH12 6h	25.24	25.27	30.50	30.62	-5.35	0.0245835
	25.31		30.74			
TH12 24h	25.29	25.28	31.27	31.20	-5.93	0.0164071
	25.26		31.14			
TH27 0h	24.95	24.95	31.29	31.30	-6.35	0.0122417
	24.96		31.32			
TH27 1h	25.10	25.15	31.18	31.13	-5.98	0.0158449
	25.20		31.08			
TH27 2h	25.22	25.23	31.61	31.60	-6.37	0.0120974
	25.24		31.59			
TH27 4h	25.75	25.80	32.69	32.58	-6.78	0.0091101
	25.85		32.46			
TH27 6h	26.39	26.36	32.44	32.36	-6.00	0.0156246
	26.33		32.28			
TH27 24h	25.81	25.87	31.51	31.50	-5.63	0.0201577
	25.92		31.48			



ตารางที่ 8 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ *DOT1L* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

	ABL	mean	DOT1L	mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28 24.33	24.31	29.84 30.04	29.94	-5.64	0.02009845554
TH8 1h	24.40 24.52	24.46	29.85 29.78	29.81	-5.35	0.02447230646
TH8 2h	24.26 24.41	24.34	28.73 28.81	28.77	-4.43	0.04624400170
TH8 4h	24.30 24.25	24.27	28.53 28.54	28.53	-4.26	0.05234277615
TH8 6h	24.63 24.53	24.58	28.21 28.13	28.17	-3.59	0.08302383059
TH8 24h	24.40 24.51	24.45	29.53 29.42	29.47	-5.02	0.03078637818
TH12 0h	24.29 24.33	24.31	30.06 30.02	30.04	-5.73	0.01879477887
TH12 1h	24.39 24.48	24.43	29.63 29.74	29.69	-5.25	0.02626929136
TH12 2h	24.35 24.33	24.34	28.25 28.24	28.25	-3.91	0.06657792862
TH12 4h	25.05 25.21	25.13	28.57 28.43	28.50	-3.37	0.09693812737
TH12 6h	25.24 25.31	25.27	28.94 28.94	28.94	-3.67	0.07877907333
TH12 24h	25.29 25.26	25.28	30.87 30.74	30.81	-5.53	0.02162584633
TH27 0h	24.95 24.96	24.95	31.13 30.95	31.04	-6.09	0.01468889542
TH27 1h	25.10 25.20	25.15	30.27 30.17	30.22	-5.07	0.02978995088
TH27 2h	25.22 25.24	25.23	29.04 29.15	29.10	-3.87	0.06861364200
TH27 4h	25.75 25.85	25.80	29.75 29.83	29.79	-3.99	0.06296639282
TH27 6h	26.39 26.33	26.36	30.05 30.03	30.04	-3.68	0.07825732411
TH27 24h	25.81 25.92	25.87	31.13 31.27	31.20	-5.34	0.02474403679

ตารางที่ 9 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ *PRMT5* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

	ABL	mean	PRMT5	mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28	24.31	28.22	28.18	-3.872430854	0.06827821
	24.33		28.14			
TH8 1h	24.4	24.46	28.12	28.12	-3.662994866	0.07894573
	24.52		28.13			
TH8 2h	24.26	24.34	28.20	28.24	-3.89735424	0.0671088
	24.41		28.28			
TH8 4h	24.3	24.27	27.40	27.44	-3.165387752	0.1114611
	24.25		27.47			
TH8 6h	24.63	24.58	28.15	28.15	-3.566455065	0.08440925
	24.53		28.14			
TH8 24h	24.4	24.45	27.59	27.59	-3.138314317	0.11357252
	24.51		27.59			
TH12 0h	24.29	24.31	27.62	27.61	-3.304303882	0.10122911
	24.33		27.60			
TH12 1h	24.39	24.43	28.04	28.07	-3.637264279	0.08036637
	24.48		28.09			
TH12 2h	24.35	24.34	27.82	27.79	-3.452718721	0.09133308
	24.33		27.76			
TH12 4h	25.05	25.13	28.17	28.18	-3.05205301	0.12057034
	25.21		28.20			
TH12 6h	25.24	25.27	27.55	27.63	-2.361905182	0.19453408
	25.31		27.71			
TH12 24h	25.29	25.28	29.18	29.17	-3.886466871	0.06761716
	25.26		29.15			
TH27 0h	24.95	24.95	29.85	29.82	-4.868266742	0.03423779
	24.96		29.78			
TH27 1h	25.1	25.15	29.49	29.49	-4.336682648	0.04949125
	25.2		29.49			
TH27 2h	25.22	25.23	29.69	29.72	-4.489939201	0.04450344
	25.24		29.75			
TH27 4h	25.75	25.8	29.95	29.94	-4.143929022	0.05656569
	25.85		29.94			
TH27 6h	26.39	26.36	30.03	30.20	-3.837138195	0.0699691
	26.33		30.37			
TH27 24h	25.81	25.87	29.97	30.16	-4.291953315	0.05104971
	25.92		30.36			

ตารางที่ 10 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของ SETD7 ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากดวงตา ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย IGF-1 (100ng/ml) เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

	ABL	mean	SETD7	mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta\Delta Cq}$
TH8 0h	24.28	24.31	26.37	26.36	-2.05425843	0.24077234
	24.33		26.36			
TH8 1h	24.4	24.46	26.73	26.70	-2.243419667	0.211185155
	24.52		26.67			
TH8 2h	24.26	24.34	26.87	26.87	-2.533989665	0.172660543
	24.41		26.88			
TH8 4h	24.3	24.27	26.43	26.45	-2.175182049	0.221413938
	24.25		26.46			
TH8 6h	24.63	24.58	27.35	27.63	-3.047347468	0.120964241
	24.53		27.91			
TH8 24h	24.4	24.45	26.18	26.19	-1.73855192	0.299670314
	24.51		26.20			
TH12 0h	24.29	24.31	25.61	25.70	-1.391585733	0.381145637
	24.33		25.80			
TH12 1h	24.39	24.43	26.17	26.19	-1.759103672	0.295431656
	24.48		26.20			
TH12 2h	24.35	24.34	26.06	26.11	-1.770355357	0.293136525
	24.33		26.16			
TH12 4h	25.05	25.13	27.15	27.13	-2.002840848	0.249508203
	25.21		27.11			
TH12 6h	25.24	25.27	26.78	26.74	-1.474427507	0.359876173
	25.31		26.71			
TH12 24h	25.29	25.28	27.68	27.67	-2.394144182	0.19023516
	25.26		27.67			
TH27 0h	24.95	24.95	28.41	28.51	-3.562636629	0.084632956
	24.96		28.61			
TH27 1h	25.1	25.15	28.32	28.31	-3.156705952	0.112133873
	25.2		28.30			
TH27 2h	25.22	25.23	29.06	28.87	-3.636382283	0.080415517
	25.24		28.67			
TH27 4h	25.75	25.8	29.51	29.49	-3.686941895	0.077646145
	25.85		29.46			
TH27 6h	26.39	26.36	29.43	29.36	-2.999594704	0.125035121
	26.33		29.29			
TH27 24h	25.81	25.87	28.80	28.79	-2.915551495	0.132535294
	25.92		28.77			

ตารางที่ 11 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง DZNeP และ BIX01294 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ ความเข้มแสง 620 nm

		TH8						
	unstim	IGF-1	12 uM DZNeP	DZ+IGF-1	10 uM BIX	BIX+IGF-1	10% FBS	
	0.0372	0.0382	0.0362	0.0393	0.0459	0.0478	0.0448	
	0.3228	0.4309	0.3007	0.4412	0.3834	0.5252	0.5753	
	0.2721	0.4847	0.3961	0.2947	0.4181	0.5843	0.5793	
	0.4281	0.5252	0.3346	0.4488	0.4497	0.6353	0.6985	
	0.3612	0.5231	0.4379	0.5955	0.5594	0.6581	0.6128	
	0.3900	0.4965	0.4598	0.4342	0.4718	0.6111	0.6211	
	0.3783	0.5666	0.3860	0.4264	0.4952	0.6144	0.6270	
	0.0366	0.0353	0.0442	0.0350	0.0459	0.0450	0.0480	
mean	0.3019	0.4164	0.3276	0.3756	0.3881	0.5103	0.5220	
sd	0.1404247	0.18844029	0.15493336	0.19031241	0.17785773	0.23118596	0.23793348	
%proliferation	100	137.937507	108.496191	124.417578	128.535939	169.02948	172.893894	

ตารางที่ 12 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH9 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง DZNeP และ BIX01294 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ ความเข้มแสง 620 nm

		TH9						
	unstim	IGF-1	12 uM DZNeP	DZ+IGF-1	10 uM BIX	BIX+IGF-1	10% FBS	
	0.0367	0.0359	0.0354	0.0365	0.0385	0.0481	0.0343	
	0.5534	0.6931	0.6338	0.5288	0.636	0.8037	0.6198	
	0.5509	0.7858	0.5598	0.6288	0.7288	0.8016	0.6247	
	0.6522	0.8103	0.8052	0.6923	0.6864	0.8618	0.6758	
	0.4505	0.7918	0.6742	0.7375	0.7357	0.8801	0.6389	
	0.4717	0.7829	0.7529	0.5834	0.651	0.9302	0.6923	
	0.4717	0.6859	0.7473	0.5329	0.7403	0.7621	0.6537	
	0.0360	0.0446	0.0360	0.0397	0.044	0.0518	0.0443	
mean	0.5251	0.7583	0.6955	0.6173	0.6964	0.8399	0.6509	
SD	0.07601212	0.05418572	0.090207708	0.0852175	0.04545	0.06177	0.02877	
%Proliferatic	69.2426041	100	91.72271309	81.4035782	125.313	151.146	123.959	

ตารางที่ 13 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง DZNeP และ BIX01294 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH12						
	unstim	IGF-1	12 uM DZNeP	DZ+IGF-1	10 uM BIX	BIX+IGF-1	10% FBS
	0.0452	0.0451	0.0455	0.0491	0.0402	0.0451	0.0449
	0.4583	0.5466	0.4531	0.4527	0.3810	0.5918	0.5321
	0.4507	0.6458	0.4727	0.4888	0.4349	0.5696	0.6138
	0.4598	0.7271	0.4564	0.5413	0.5185	0.5973	0.5692
	0.4797	0.6608	0.4905	0.5406	0.4918	0.7294	0.6765
	0.5066	0.6049	0.5116	0.5525	0.4966	0.6550	0.5731
	0.5099	0.5753	0.4875	0.5340	0.4324	0.6055	0.7422
	0.0353	0.0389	0.0423	0.0386	0.0453	0.0448	0.045
mean	0.4775	0.6268	0.4786	0.5183	0.4592	0.6248	0.6178
SD	0.02569661	0.06502457	0.022305664	0.03902827	0.05177254	0.05851149	0.07828
%Proliferatic	76.1866773	100	76.36750432	82.6991092	73.2668528	99.6835527	132.883

ตารางที่ 14 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง Pinometostat และ SGC707 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH8						
	1%	IGF-1	9 uM Pino	Pino+IGF-1	6.4 uM 707	707+IGF-1	10%
	0.0500	0.0415	0.0364	0.0503	0.0466	0.0399	0.0442
	0.3368	0.4151	0.3125	0.3924	0.2688	0.3306	0.3880
	0.3276	0.4558	0.3703	0.4692	0.2721	0.3580	0.4657
	0.3124	0.4361	0.4256	0.4783	0.3623	0.3663	0.5499
	0.3441	0.4559	0.3767	0.5839	0.4014	0.3922	0.4789
	0.3393	0.4104	0.4117	0.4963	0.3576	0.4400	0.5063
	0.2706	0.5147	0.3488	0.4735	0.2925	0.4372	0.4913
	0.0463	0.0462	0.0356	0.0454	0.0453	0.0440	0.0418
mean	0.3417	0.4555	0.3961	0.4823	0.3535	0.3874	0.4800
SD	0.00339	0.03713	0.0268055	0.0614257	0.045128	0.044285	0.05362
%Proliferation	100	133.31	115.91308	141.13745	103.4387	113.3694	140.479

ตารางที่ 15 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง Pinometostat และ SGC707 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH12						
	1%	IGF-1	Pino 2X	IGF-1+2X	707 2X	IGF-1+2X	10%
	0.0383	0.0401	0.0409	0.0440	0.0374	0.0429	0.0353
	0.3823	0.4542	0.4279	0.4428	0.3122	0.3611	0.3919
	0.4192	0.4599	0.3520	0.3853	0.3427	0.4049	0.4359
	0.4315	0.5114	0.4103	0.4142	0.3352	0.4326	0.4430
	0.3748	0.4667	0.3530	0.4697	0.3825	0.4813	0.4215
	0.3751	0.4738	0.3529	0.4368	0.3981	0.4388	0.4323
	0.2975	0.6229	0.3669	0.4793	0.3896	0.5500	0.4656
	0.0416	0.0353	0.0438	0.0340	0.0352	0.0357	0.0391
mean	0.3966	0.4982	0.3772	0.4380	0.3601	0.4448	0.4317
SD	0.02679	0.06437	0.03342	0.03487	0.03474	0.06509	0.02443
%proliferation	100	125.611	95.1048	110.449	90.7887	112.155	108.856

ตารางที่ 16 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง Pinometostat และ SGC707 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH27						
	1%	IGF-1	9 uM pino	ino+IGF-1	6.4 uM 707	707+IGF-1	10%
	0.0475	0.0493	0.0470	0.0425	0.0409	0.0727	0.0847
	0.3543	0.4475	0.3403	0.4372	0.3663	0.4753	0.4529
	0.3164	0.4471	0.3936	0.5119	0.3867	0.5757	0.5170
	0.4117	0.4449	0.3714	0.4854	0.4888	0.5273	0.4709
	0.4014	0.4851	0.3760	0.5827	0.4517	0.5616	0.5039
	0.3692	0.4928	0.3965	0.5106	0.4826	0.5259	0.5005
	0.2972	0.5587	0.4147	0.5678	0.3888	0.4417	0.4946
	0.0469	0.0354	0.0333	0.0342	0.0384	0.0386	0.0381
mean	0.3706	0.4794	0.3821	0.5159	0.4275	0.5179	0.4900
SD	0.03822	0.04416	0.025695557	0.05352	0.053454856	0.051037414	0.02364
%proliferation	100	129.344	103.0985789	139.216	115.3489836	139.7508545	132.209

ตารางที่ 17 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง UNC0379 และ GSK591 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH8						
	1%	IGF-1	31.2 uM 0379	0379+IGF-1	10 uM 591	591+IGF-1	10%
	0.0387	0.0432	0.0399	0.0476	0.0378	0.0389	0.0385
	0.3615	0.4178	0.4284	0.5107	0.4149	0.4363	0.4014
	0.2970	0.4066	0.4084	0.4424	0.3510	0.4048	0.3843
	0.3309	0.4922	0.4012	0.5526	0.5409	0.3815	0.4525
	0.3831	0.5124	0.4525	0.5599	0.4671	0.4376	0.4277
	0.3829	0.4232	0.3839	0.4218	0.3466	0.4246	0.4809
	0.3674	0.4280	0.3521	0.4452	0.3665	0.4569	0.4849
	0.0347	0.0437	0.0458	0.0353	0.0340	0.0354	0.0345
mean	0.3538	0.4467	0.4044	0.4888	0.4145	0.4236	0.4386
SD	0.03376	0.04412	0.034846487	0.060246449	0.07705912	0.026806821	0.04142
%Proliferation	100	126.258	114.3065762	138.1477294	117.1565856	119.733371	123.973

ตารางที่ 18 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง UNC0379 และ GSK591 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH12						
	1%	IGF-1	31.2 uM 0379	0379+IGF-1	10 uM 591	591+IGF-1	10%
	0.0519	0.0378	0.0376	0.0470	0.0459	0.1535	0.0536
	0.3746	0.4996	0.3778	0.6024	0.4047	0.7113	0.6912
	0.3354	0.4685	0.4036	0.4297	0.3984	0.4908	0.7332
	0.4166	0.5089	0.4436	0.4652	0.3788	0.5513	0.7789
	0.3978	0.5440	0.3470	0.4470	0.3738	0.5066	0.5722
	0.3757	0.5493	0.4197	0.4195	0.4200	0.4304	0.5793
	0.3883	0.4572	0.3988	0.4374	0.3734	0.4254	0.5139
	0.0511	0.0503	0.0517	0.0372	0.0509	0.0481	0.0495
mean	0.3814	0.5046	0.3984	0.4669	0.3915	0.5193	0.6448
SD	0.02739	0.0378	0.03343725	0.068205562	0.019163968	0.105434302	0.10454
%proliferation	100	132.298	104.4616326	122.4086698	102.6525083	136.1562664	169.057

ตารางที่ 19 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง UNC0379 และ GSK591 ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH27						
	1%	IGF-1	31.2 uM 0379	0379+IGF-1	10 uM 591	591+IGF-1	10%
	0.0353	0.0357	0.0380	0.0449	0.0368	0.0356	0.0355
	0.2933	0.4203	0.3079	0.5900	0.3747	0.4334	0.3839
	0.5622	0.5909	0.5356	0.5665	0.5038	0.5652	0.5002
	0.3291	0.7908	0.7434	0.7055	0.5598	0.6251	0.4246
	0.3980	0.7473	0.6258	0.6730	0.5807	0.7374	0.4481
	0.3241	0.5213	0.4825	0.5762	0.5405	0.6845	0.4153
	0.2114	0.4328	0.3376	0.2986	0.4139	0.5213	0.4987
	0.0334	0.0359	0.0430	0.0419	0.0369	0.0436	0.0433
mean	0.3957	0.5839	0.5390	0.5683	0.4956	0.5945	0.4451
SD	0.11923	0.25182	0.162730308	0.238247854	0.189323408	0.231569266	0.15778
%proliferation	100	147.58	136.2416277	143.637053	125.2538018	150.2548549	112.507

ตารางที่ 20 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง CPI360 และ PFI-2HCL ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH8						
	1%	IGF-1	6 uM 360	360+IGF-1	8 uM PFI	PFI+IGF-1	10%
	0.0372	0.0389	0.0366	0.0345	0.0376	0.0372	0.0355
	0.3623	0.4409	0.3824	0.4425	0.3447	0.3762	0.3964
	0.3101	0.3635	0.3523	0.4253	0.3651	0.3752	0.4283
	0.3351	0.3599	0.4810	0.5359	0.4133	0.3934	0.4402
	0.3658	0.4335	0.4112	0.4750	0.2801	0.4121	0.4916
	0.4507	0.3805	0.3625	0.3770	0.3377	0.4413	0.4769
	0.2638	0.3416	0.3400	0.5014	0.5119	0.4922	0.5398
	0.0363	0.0355	0.0374	0.0352	0.0348	0.0380	0.0373
mean	0.3648	0.3957	0.3882	0.4595	0.4088	0.4151	0.4622
SD	0.05306	0.0388	0.051859451	0.056741005	0.064585045	0.045201667	0.05112
%proliferation	100	108.459	106.4236111	125.9639985	112.0476974	113.7792398	126.7



ตารางที่ 21 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง CPI360 และ PFI-2HCL ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH12						
	1%	IGF-1	6 uM 360	360+IGF-1	8 uM PFI	PFI+IGF-1	10%
	0.0359	0.0377	0.0386	0.0363	0.0347	0.0354	0.0400
	0.3932	0.3883	0.3461	0.3217	0.2837	0.2778	0.3983
	0.2895	0.3857	0.3660	0.3531	0.2638	0.3425	0.3759
	0.2852	0.3981	0.2937	0.3684	0.2474	0.3532	0.3885
	0.2883	0.3605	0.2688	0.3682	0.3399	0.3439	0.3188
	0.3092	0.5620	0.2859	0.3739	0.2586	0.3938	0.4040
	0.3017	0.2640	0.2919	0.3855	0.3474	0.3587	0.4037
	0.0350	0.0391	0.0391	0.0405	0.0347	0.0369	0.0409
mean	0.3131	0.4189	0.3121	0.3618	0.2964	0.3450	0.3771
SD	0.04578	0.08118	0.041716603	0.022254528	0.045050782	0.037840899	0.03429
%proliferation	100	133.806	99.68698096	115.5615178	94.68506452	110.1901537	120.448

ตารางที่ 22 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย IGF-1 และผลของสารยับยั้ง CPI360 และ PFI-2HCL ต่อการลดการเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วย้อมเซลล์ด้วย 1% methylene blue และวัดที่ความเข้มแสง 620 nm

	TH27						
	1%	IGF-1	6 uM 360	360+IGF-1	8 uM PFI	PFI+IGF-1	10%
	0.0356	0.0390	0.0521	0.0510	0.0507	0.0398	0.0534
	0.2233	0.2952	0.2898	0.3220	0.3073	0.3112	0.3590
	0.3251	0.3330	0.3138	0.3754	0.2470	0.2820	0.2883
	0.2623	0.3074	0.3714	0.4369	0.2577	0.3568	0.3835
	0.3930	0.3333	0.3617	0.4976	0.2655	0.3952	0.3430
	0.2980	0.3911	0.3298	0.4641	0.2657	0.3795	0.0671
	0.2253	0.3065	0.3330	0.4437	0.3945	0.3522	0.3932
	0.0443	0.0432	0.0434	0.0352	0.0394	0.0434	0.0517
mean	0.3003	0.3278	0.3333	0.4233	0.2896	0.3462	0.3057
SD	0.06439	0.03463	0.030142976	0.063784557	0.055320319	0.042437896	0.12262
%proliferation	100	109.126	110.9575814	140.9347184	96.42960201	115.2527136	101.779

ตารางที่ 23 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 I\_GO\_TH12 และ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นด้วย IGF-1 ต่อการผลิต IL-6 จากการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

dataverwerking

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0643	1.0330	2.1253	2.3120	1.9854	1.9285	1.8059	1.8720	1.8292	1.8299	1.7894	1.5917
B	0.6504	0.6380	2.0819	2.1781	2.1544	1.9861	1.7392	1.8269	1.7942	1.7414	1.6449	1.6211
C	0.3918	0.3979	1.9661	2.0764	2.0978	2.0294	1.8660	1.8790	1.8270	1.8070	1.7023	1.6039
D	0.2358	0.2250	1.8416	1.9366	2.0732	2.0242	1.8591	1.9121	1.8658	1.8313	1.6814	1.5847
E	0.1551	0.1663	1.9727	1.9956			1.8336	1.9013	1.6845	1.6740	1.6880	1.6000
F	0.1067	0.1004	1.8379	2.2539			1.8745	1.8511	1.6535	1.6599	1.6204	1.6083
G	0.0807	0.0763	1.7687	1.8432			1.7062	1.7579	1.6681	1.7400	1.5999	1.4712
H	0.0550	0.0554	1.8061	1.8162			1.7387	1.7718	1.8276	1.6933	1.5530	1.5149

Als er een nieuwe ijklijn geladen moet worden: CTRL-L

standaardlijn

conc	log conc	ext1	ext2	gem ext	gem ext	logit	berekende
pg/ml					- blanco	ext-bla	ijklijn
500.00	2.70	1.0643	1.0330	1.049	0.993	-0.13	-0.20
250.00	2.40	0.6504	0.6380	0.644	0.589	-0.96	-0.91
125.00	2.10	0.3918	0.3979	0.395	0.340	-1.66	-1.63
62.50	1.80	0.2358	0.2250	0.230	0.175	-2.41	-2.34
31.30	1.50	0.1551	0.1663	0.161	0.106	-2.95	-3.05
15.60	1.19	0.1067	0.1004	0.104	0.048	-3.76	-3.77
7.80	0.89	0.0807	0.0763	0.079	0.023	-4.50	-4.49
0.0	n.v.t.	0.0550	0.0554	0.055	n.v.t.		

2x hoogste standaard:	2.129
intercept:	-6.602
slope	2.373
ondergrens (pg/ml)	1.706
corr.coeff	0.999

N.B.

Indien de standaard reeks bestaat uit minder dan 7 punten, dan moeten de coördinaten waarmee de ijklijn berekend wordt aangepast worden in cel D28, D29 en D31.

ตารางที่ 23 ค่าปริมาณ IL-6 ของเซลล์ I\_GO\_TH8 I\_GO\_TH12 และ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นด้วย IGF-1 ที่ได้จากคำนวณและตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

Bewerkte data, weergegeven in pg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8				
A	547.8	517.3	96478.1	#NUM!	27556.3	20957.4	13412.7	16756.0	14451.4	14484.7	12750.1	7642.8
B	241.8	235.1	55157.1	947211.9	190674.5	27660.8	11031.6	14342.9	12937.2	11098.9	8655.2	8179.1
C	119.6	122.1	24937.9	52275.7	65523.0	35925.1	16396.2	17193.3	14347.6	13458.9	9993.0	7858.9
D	60.3	56.5	15060.8	21714.2	50729.2	34699.7	15998.5	19561.0	16384.4	14551.6	9471.2	7522.8
E	32.6	36.3	25780.4	29153.3			14662.8	18728.5	9545.9	9296.5	9631.3	7788.9
F	16.8	14.7	14874.5	#NUM!			16909.9	15557.8	8837.6	8977.1	8165.7	7939.0
G	8.4	6.9	11992.0	15142.6			10095.3	11625.3	9160.8	11056.0	7787.1	5898.7
H	#NUM!	0.1	13421.1	13855.9			11016.4	12100.8	14375.8	9763.0	7011.6	6460.1

ตารางที่ 24 ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ I\_GO\_TH8 I\_GO\_TH12 และ I\_GO\_TH27 ที่กระตุ้นด้วย IGF-1 ต่อการผลิต hyaluronan จากการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

A dataverwerking												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6304	0.5999	0.4122	0.3750	0.1700	0.3923	0.3086	0.3388	0.2748	0.2854	0.1614	0.0412
B	0.4528	0.4491	0.5517	0.5472	0.2085	0.5242	0.5277	0.2047	0.4233	0.4362	0.1996	0.0380
C	0.2641	0.2540	0.2726	0.2662	0.4277	0.2572	0.2511	0.2914	0.2750	0.2782	0.2437	0.0364
D	0.1446	0.1387	0.4166	0.4083	0.4644	0.4208	0.4107	0.3199	0.4009	0.3906	0.3070	0.0365
E	0.0933	0.0843	0.2791	0.2754	0.2435	0.2562	0.2559	0.1850	0.2575	0.2550	0.2334	0.0386
F	0.0645	0.0615	0.3734	0.3709	0.2524	0.4438	0.4338	0.2026	0.4366	0.4495	0.2201	0.0372
G	0.0589	0.0555	0.2719	0.2759	0.3842	0.2520	0.2457	0.3801	0.2793	0.2885	0.2880	0.0398
H	0.0654	0.0625	0.4169	0.4205	0.3401	0.3880	0.4084	0.3717	0.4189	0.4880	0.4108	0.0395

Als er een nieuwe ijklijn geladen moet worden: CTRL-L

standaardlijn							
conc	log conc	ext1	ext2	gem ext	gem ext - blanco	logit	berekende ijklijn
90.00	1.95	0.6304	0.5999	0.615	0.551	-0.25	#NUM!
30.00	1.48	0.4528	0.4491	0.451	0.387	-0.81	#NUM!
10.00	1.00	0.2641	0.2540	0.259	0.195	-1.70	#NUM!
3.33	0.52	0.1446	0.1387	0.142	0.078	-2.72	#NUM!
1.11	0.05	0.0933	0.0843	0.089	0.025	-3.91	#NUM!
0.37	-0.43	0.0645	0.0615	0.063	-0.001	#NUM!	#NUM!
0.12	-0.92	0.0589	0.0555	0.057	-0.007	#NUM!	#NUM!
0.0	n.v.t.	0.0654	0.0625	0.064	n.v.t.		

## เอกสารอ้างอิง

1. Christian M.G., Bernard L.C., Jack R.W., Current Concepts in Graves' Disease, *The Adv Endocrinol Metab.* 2011 Jun; 2(3): 135–144.
2. Smith, T.J. and L. Hegedus, Graves' Disease. *N Engl J Med*, 2016. 375(16): p. 1552-1565.
3. Bahn, R.S., Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*, 2010. 362(8): p. 726-38.
4. Rebecca S. Bahn, Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy, *Horm Metab Res* 2015; 47: 773–778
5. Dik, W.A., S. Virakul, and L. van Steensel, Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res*, 2016. 142: p. 83-91.
6. Smith, T.J., The insulin-like growth factor-I receptor and its role in thyroid-associated ophthalmopathy. *Eye* 2019. 33: p. 200–205.
7. Iams, Wade T., and Christine M. Lovly. "Molecular pathways: clinical applications and future direction of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade." *Clinical Cancer Research* 21.19 (2015): 4270-4277.
8. Miell, JOHN P., et al. "Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone-and IGF-binding proteins." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76.4 (1993): 950-955.
9. Smith TJ. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacol Rev.* 2010. 62: p. 199–236.
10. Krieger, C.C., et al., Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobins. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. 100(3): p. 1071-7.
11. Paik J.S., Kim S.E., Kim J.H., Lee J.Y., Yang S.W., Lee S.B., Insulin-like growth factor-1 enhances the expression of functional TSH receptor in orbital fibroblasts from thyroid-associated ophthalmopathy. *Immunobiology.* 2019 Dec 25:151902
12. Smith, T.J., Huetwell F.G., Hegedüs L., Douglas R.S., Role of IGF-1 pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun; 26(3): 291–302.
13. Rebecca S. Bahn, Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy, *Horm Metab Res* 2015; 47: 773–778

14. Wiersinga, W.M., *Advances in treatment of active, moderate-to-severe Graves' ophthalmopathy*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017. 5(2): p. 134-142.
15. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. *Nature*, 2000. 403(6765): p.41-5.
16. McCullough, Shaun D., and Dana Dolinoy, eds. *Toxicopigenetics: Core Principles and Applications*. Academic Press, 2019.
17. Araki Y. and Mimura T., *The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Disease*. *Mediators Inflamm*. 2017.
18. Pei-Suen Tsou, P. C. *Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma*. *PNAS*. 2019.
19. Ligresti G., Caporarello N., Meridew J.A., *CBX5/G9a/H3K9me-mediated gene repression is essential to fibroblast activation during lung fibrosis*. *JCI insight*. 2019.
20. Liu, Lirong, et al. "Blocking the histone lysine 79 methyltransferase DOT1L alleviates renal fibrosis through inhibition of renal fibroblast activation and epithelial-mesenchymal transition." *The FASEB Journal* 33.11 (2019): 11941-11958.
21. Tamura, Ryo, et al. "Inhibition of the H3K4 methyltransferase SET7/9 ameliorates peritoneal fibrosis." *PloS one* 13.5 (2018).
22. 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.
23. Hung, Chi F., et al. "Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation." *Respiratory research* 14.1 (2013): 102.
24. Stone, Rivka C., et al. "Diverging antioxidative responses to IGF-1 in cultured human skin fibroblasts versus vascular endothelial cells." *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* 67.9 (2012): 939-946.
25. Shi, Yingfeng, et al. "Blockade of enhancer of zeste homolog 2 alleviates renal injury associated with hyperuricemia." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 316.3 (2019): F488-F505.
26. Irifuku, Taisuke, et al. "Inhibition of H3K9 histone methyltransferase G9a attenuates renal fibrosis and retains klotho expression." *Kidney international* 89.1 (2016): 147-157.

27. Zhang, Long, et al. "Loss of Histone H3 K79 Methyltransferase Dot1l Facilitates Kidney Fibrosis by Upregulating Endothelin 1 through Histone Deacetylase 2." *Journal of the American Society of Nephrology* 31.2 (2020): 337-349.
28. Gan, Lu, et al. "Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential." *Biomarker research* 6.1 (2018): 10.
29. Pritchard J, Horst N, Cruikshank W, Smith TJ (2002) Igs from patients with Graves' disease induce the expression of T cell chemoattractants in their fibroblasts. *J Immunol* 168: 942–950.
30. Imai, Yumi, et al. "Effect of growth factors on hyaluronan and proteoglycan synthesis by retroocular tissue fibroblasts of Graves' ophthalmopathy in culture." *European Journal of Endocrinology* 126.6 (1992): 541-552.
31. Chen, H., et al., *Teprotumumab, an IGF-1R blocking monoclonal antibody inhibits TSH and IGF-1 action in fibrocytes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. 99(9): p. E1635-40.