



Induction of chondrocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by TGF- β signaling pathway กลไกในการพัฒนา chondrocyte จากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์โดยการเหนี่ยวนำของ TGF- β

การเพาะเลี้ยงและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ของมนุษย์เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่กำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัย เนื่องจากเป็นความหวังที่จะใช้เซลล์เนื้อเยื่อที่พัฒนาได้ไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยซึ่งต้องการการทดแทนเซลล์เนื้อเยื่อที่ผิดปกติเหล่านี้ เช่น ในเด็กที่มีความพิการตั้งแต่กำเนิดในการพัฒนาของกระดูกอ่อน (cartilage) ในช่องปาก, joint arthritis, joint injury เป็นต้น ซึ่งการรักษาในปัจจุบันยังมีข้อจำกัด เซลล์ต้นกำเนิดชนิด human mesenchymal stem cells (hMSCs) กำลังเป็นที่สนใจเนื่องจากสามารถพัฒนาได้จากเซลล์ของผู้ป่วยเองและสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ในร่างกายได้หลายชนิด เช่น osteoblasts, chondrocytes และ adipocytes งานวิจัยที่จะต่อยอดจากองค์ความรู้ดังกล่าวจึงอยู่ที่การศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกการควบคุมระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการพัฒนาเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งงานวิจัยที่ศึกษากลไกในระดับยีนที่ควบคุมการพัฒนาของ chondrocyte (chondrocyte differentiation) มีอยู่ค่อนข้างจำกัด แต่ในปัจจุบันพบว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำให้ hMSCs พัฒนาไปเป็น chondrocyte ได้ จึงมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ chondrocyte differentiation มากขึ้น โดย TGF- β เป็น growth factor ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ proliferation, differentiation, cell adhesion และ apoptosis ของเซลล์ มี 3 ชนิด คือ TGF- β 1, 2 และ 3 ซึ่งทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้น chondrocyte differentiation ได้เหมือนกัน พบว่า TGF- β นอกจากจะส่ง signal โดยผ่านทาง Smad2 และ Smad3 แล้ว signaling ของ TGF- β ยังเกี่ยวข้องกับ extracellular signal-regulated kinase (ERK) และ Wnt signaling pathway ด้วย ในส่วนของ Smad2 และ Smad3 ซึ่งเป็น effector ที่ช่วยในการส่ง signal ของ TGF- β ไปยังนิวเคลียสนั้นมีการศึกษาของ Ferguson และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ของ TGF- β 1 กับ Smad2 และ Smad3 ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ chondrocyte พบว่า TGF- β 1 ยับยั้งการ expression ของ collagen type X และ Alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งเป็น marker ของการพัฒนาของ chondrocyte ในระยะท้าย โดยผ่านทาง Smad2 และ Smad3 ส่วน Wnt signaling pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับ adhesion molecules ของเซลล์ โดยมี β -catenin เป็น transcription factor ที่สำคัญ จากการศึกษาของ Zhou และคณะ (2004) โดยใช้ hMSCs line KM101 พบว่ามีการ expressed ยีนที่เกี่ยวข้องกับ TGF- β และ Wnt signaling pathway และ TGF- β 1 สามารถเพิ่ม stability และกระตุ้นการสะสมของ β -catenin ในนิวเคลียสได้และพบ synergy ของ TGF- β 1 และ Wnt signaling pathway ในการกระตุ้นการ expressed ของ collagen type II gene ด้วย ส่วนการกระตุ้นโดยผ่านทาง ERK signaling pathway การกระตุ้นจะเป็น cascade โดยเริ่มจากกระตุ้นผ่าน Ras, MEK และ ERK ซึ่ง ERK ที่ถูก phosphorylated ทำหน้าที่เป็น transcription factor จากการศึกษาของ Lee และคณะ (2004) โดยใช้ TGF- β 3 ซึ่งจากการศึกษาก่อนนี้พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาของ chondrocyte ได้ดีกว่า TGF- β 1 และ 2 พบว่าในการเหนี่ยวนำให้ MSCs กลายเป็น chondrocyte โดยใช้ TGF- β 3 พบการ expressed ของ collagen type II gene ซึ่งเป็น marker ของการพัฒนา chondrocyte ในระยะแรก แต่ในสภาวะที่มี MEK inhibitor จะยับยั้งการ expression ของยีนนี้ และพบว่า TGF- β 3 สามารถเพิ่ม ERK ที่ถูก phosphorylated ได้ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า TGF- β ส่งผ่าน signal ไปสู่การพัฒนาของ chondrocyte โดยเกี่ยวข้องกับ ERK signaling pathway จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า TGF- β signaling

pathway ควบคุมการพัฒนาของ chondrocyte โดยการส่ง signal ผ่าน pathway อื่นด้วย คือ ERK และ Wnt signaling pathway อย่างไรก็ตามกลไกที่แท้จริงในการควบคุมการพัฒนาของเซลล์ chondrocyte ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการควบคุม chondrocyte differentiation ซึ่งจะขยายผลไปสู่การรักษาโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ferguson C, Schward E, Reynolds P et al. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 2000; 141: 4728-35.
2. Zhou S, Eid K, Glowacki J et al. Cooperation between TGF- β and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 463-70.
3. Lee JW, Kim YH, Kim SH et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical application. *Yonsei Med* 2004; 45: 41-7.

นำเสนอโดย : นางสาว จิราพร จรอนันต์
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. พัชรี เจียรนัยกุล

The study of α/β globin mRNA ratio in α - thalassemia การศึกษาอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในอัลฟาธาลัสซีเมีย

อัลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคกรรมพันธุ์ที่เกิดจากการขาดหายไป (deletion) หรือการกลายพันธุ์ (non-deletion) ของ α - globin gene โดยความรุนแรงของอัลฟาธาลัสซีเมียจะขึ้นกับจำนวนยีนที่ผิดปกติไปจากปกติซึ่งมี 4 ยีน การศึกษาข้อมูลทางโลหิตวิทยาของอัลฟาธาลัสซีเมียพบว่า ผู้ที่มี α - globin gene ผิดปกติตั้งแต่ 2 ยีนขึ้นไปจะมี ข้อมูลทางโลหิตวิทยาแตกต่างจากปกติคือจะมีค่า Hb, MCV, MCH และ MCHC ต่ำกว่าคนปกติ แต่ค่า RBC จะ สูงกว่าคนปกติ เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิค in vitro hemoglobin synthesis พบว่า α/β globin ratio ในอัลฟาธาลัสซีเมียที่มีจีโนไทป์ต่างๆนั้น มีแนวโน้มลดลงแปรตามจำนวนยีนที่ผิดปกติ คือ $\alpha\alpha/\alpha\alpha = 1.06 \pm 0.11$, $-\alpha/\alpha\alpha = 0.87 \pm 0.12$, $---/\alpha\alpha = 0.66 \pm 0.12$ และ $---/-\alpha = 0.44 \pm 0.20$ การศึกษาในระดับ mRNA ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ในปี 1980 Hunt DM และคณะ ได้ตรวจวัด α/β globin mRNA ratio ในอัลฟาธาลัสซีเมีย ด้วยวิธี cDNA/RNA Liquid hybridization พบว่า สามารถแยกอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดต่างๆออกจากกันได้ โดยอัตราส่วนของคนปกติเท่ากับ 2.27 และคนที่ เป็นอัลฟาธาลัสซีเมียจะมีอัตราส่วนลดลงตามจำนวนของยีนที่ขาดหายไป แต่การศึกษาค้างนี้ไม่มีการตรวจดีเอ็นเอเพื่อบอกจีโนไทป์ที่แน่นอนของอัลฟาธาลัสซีเมีย ใช้เพียงประวัติครอบครัวในการบอกจีโนไทป์ ต่อมาในปี 1996 Smetanina NS และคณะ ได้ศึกษา α/β - และ $\alpha 2/\alpha 1$ - globin mRNA ratio ในกลุ่มอัลฟาธาลัสซีเมียเช่นกัน แต่ใช้เทคนิค PCR โดยติดฉลาก primer ด้วย ^{32}P เมื่อทำ auto-radiography และเปรียบเทียบปริมาณของ α - และ β - mRNA โดยวัดความเข้มของ band บนแผ่นฟิล์มด้วยเครื่อง Shimadzu CS 9000 densitometer พบว่า อัตราส่วนของคนปกติเท่ากับ 4.33 และอัตราส่วนจะลดลงในอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ต่อมาในปี 2000 Watanapokasin Y และคณะ ได้นำเทคนิค quantitative real-time RT-PCR มาใช้ในการตรวจวัด α/β globin mRNA ratio ในผู้ป่วย β - thalassemia/Hb E ชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ α/β globin mRNA ratio และความรุนแรงของโรค โดยการใช้ TaqMan probe ที่จำเพาะต่อ α - และ β - globin mRNA ในการตรวจวัดปริมาณ พบว่าอัตราส่วนของคนปกติอยู่ในช่วง 0.97-1.20 และอัตราส่วนเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วย β - thalassemia/Hb E และแปรผันตามความรุนแรงของภาวะซีด จากข้อมูลที่มีอยู่ในขณะนี้ไม่สามารถบอกได้แน่นอนถึงอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในคนปกติ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิคในการตรวจวัด อย่างไรก็ตามอัตราส่วนที่ตรวจวัดได้ในอัลฟาธาลัสซีเมียมีแนวโน้มลดลง และแปรผันตามจำนวนยีนที่ลดลง การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA โดยใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น น่าจะเป็นข้อมูลหนึ่งที่มีประโยชน์ในการอธิบายความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันได้

เอกสารอ้างอิง

1. Hunt DM, Higgs DR, Old JM, Clegg JB, Weatherall DJ, Marsh GW. Determination of alpha thalassemia phenotypes by messenger RNA analysis. Br J Haematol 1980; 45: 53-64.
2. Smetanina NS, Leonova JY, Levy N, Huisman THJ. The α/β - and $\alpha 2/\alpha 1$ - globin mRNA ratios in different form of α - thalassemia. Biochim Biophys Acta 1996;1315: 188-92.
3. Watanapokasin Y, Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P. Relative quantitation of mRNA in β - thalassemia/Hb E using real-time PCR. Hemoglobin 2000; 24: 105-16.

นำเสนอโดย : นางสาวจุฬาร ใจชื่อ

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุทธิพรธณ กิจเจริญ

SPI-2 in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*

บทบาทหน้าที่ และการควบคุม SPI-2 ในเชื้อ *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*

เชื้อ *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) เป็น intracellular pathogen ที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหาร โดยมี Type III secretion systems (TTSS) ที่ encode จาก *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-1 และ SPI-2 เป็น virulence factors ทำหน้าที่ขนส่ง effector proteins เข้าสู่ cytoplasm ของ host cells ก่อให้เกิดการบุกรุกและการเจริญภายในเซลล์ได้ จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า SPI-2 mutants ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารใกล้เคียงกับ wild type *S. typhimurium* แสดงว่า SPI-2 ไม่มีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพในลำไส้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงบทบาทที่แท้จริงของ SPI-2 ได้ ดังนั้นในปี 2005 Coburn B และคณะ จึงได้ศึกษาถึงบทบาทของ SPI-2 ใน Streptomycin-pretreated mice ที่ได้รับเชื้อ *S. typhimurium* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า หนูที่ได้รับเชื้อ SPI-2 mutants ให้ผลสอดคล้องกับหนูที่ได้รับเชื้อ SPI-1 mutants คือไม่แสดงพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหาร แสดงว่านอกจาก SPI-1 และ SPI-2 สามารถก่อพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาในปี 2005 ของ Hapfelmeier S และคณะ พบว่า SPI-1 และ SPI-2 บุกรุกกลุ่มของ lymphocyte cells ในชั้น lamina propria ได้ต่างกลุ่มกัน ดังนั้นทาง Hapfelmeier S และคณะจึงศึกษากลไกการทำงานของ SPI-1 และ SPI-2 ในหนู wild type และหนูที่ขาด MyD88 ผลการทดลองพบว่า SPI-2 mutants ก่อให้เกิดการอักเสบแบบกระจาย (diffuse cecal inflammation) โดยไม่ต้องอาศัยการส่งสัญญาณผ่าน MyD88 แต่ SPI-1 mutants ก่อให้เกิดการอักเสบแบบเฉพาะที่ (focal mucosal inflammation) โดยอาศัยการส่งสัญญาณผ่าน MyD88 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า *S. typhimurium* สามารถก่อให้เกิดลำไส้อักเสบโดย 2 กลไก คือ 1. ใช้ SPI-1 ในการบุกรุก epithelial cells โดยไม่ผ่านการกระตุ้น MyD88 และ 2. อาศัย SPI-2 ในการเจริญภายในเซลล์ โดยกระตุ้นผ่าน MyD88 แล้วก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันระหว่าง SPI-1 และ SPI-2 นอกจากนี้ยังพบว่า *S. typhimurium* ต้องการ SlyA ในการเจริญภายใน vacuole ของ macrophages เนื่องจาก SlyA เป็น transcriptional regulator ที่มีความสามารถกระตุ้นให้ *S. typhimurium* ทนต่อ oxyradicals (H₂O₂) ที่สร้างจาก NADPH phagocyte oxidase ภายใน macrophages ได้ ดังนั้น Sheena A และคณะ ในปี 2005 จึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SPI-2 และ SlyA ในหนู ที่ได้รับทั้ง SlyA mutants และ SPI-2 mutants ผลการทดลองพบว่า ความรุนแรงของ SPI-2 mutants จะลดลงอย่างมาก ในขณะที่ความรุนแรงของ SlyA mutants จะลดลงเพียงเล็กน้อยแต่พบร่วมกับการทำงานลดลงของ SPI-2 mutants เช่น การสร้าง filaments หรือการขนส่ง SPI-2 effector SseJ จากผลการทดลองแสดงว่าการทำงานหรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ SPI-2 TTSS ต้องอาศัยการควบคุมโดย SlyA โดยจากผลการศึกษาทั้งหมดจะบอกให้ทราบถึงบทบาท หน้าที่รวมถึงการควบคุมการทำงานของ SPI-2 ใน *S. typhimurium* ซึ่งเราสามารถนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการรักษา (antibiotic target) หรืออาจจะนำเอาความรู้ในเรื่องของ TTSS ไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งวัคซีนเข้าสู่ antigen presenting cells (APCs) เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันก็ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Coburn B. et al., *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Pathogenicity Island 2 Is Necessary for Complete Virulence in a Mouse Model of Infectious Enterocolitis. *Infect Immun* 2005; 73: 3219-27.
2. Hapfelmeier S. et al., The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-2 and SPI-1 Type III Secretion Systems Allow *Salmonella* Serovar *typhimurium* to Trigger Colitis via MyD88-Dependent and MyD88-Independent Mechanisms. *J Immunol* 2005; 147: 1675-85.
3. Sheena A. et al., SlyA Regulates Function of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) and Expression of SPI-2-Associated Genes. *Infect Immun* 2005; 73: 4354-62.

นำเสนอโดย : นางสาวชลธิดา สุภาพรม

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กาญจนา เลิศมีมงคลชัย

Dengue virus antagonizes antiviral effect of Interferons (IFN- α/β) เชื้อไวรัสเด็งกีต่อต้านขบวนการกำจัดไวรัสของสารอินเตอร์เฟอรอน

การติดเชื้อไวรัสเด็งกี (Dengue Virus) เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการโรคไข้เลือดออกซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญเนื่องจากการระบาดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ทั่วโลก เมื่อติดเชื้อไวรัสร่างกายต้องอาศัยระบบภูมิคุ้มกันทั้ง Innate immunity, Interferons (IFNs) และ Adaptive immunity เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัสและกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อออกไป อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อหรือความสามารถของไวรัสในการต่อต้านการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด Shresta และคณะ (2004) ได้เปรียบเทียบบทบาทของ IFNs ระหว่าง IFN- α/β , IFN- γ และ adaptive immunity ในการต้านการติดเชื้อไวรัสเด็งกี โดยใช้หนู congenic mice ที่สูญเสียการทำหน้าที่ของ receptor ต่อระบบ IFNs เปรียบเทียบกับหนู wild type ผลการทดลองพบว่าหนูที่ขาดการทำหน้าที่ของ IFN- α/β ไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของไวรัสในระบบเลือดและน้ำเหลืองได้ แตกต่างกับหนูที่ขาด IFN- γ และหนูที่ขาด B, CD4+ T หรือ CD8+ T cells ที่ยังคงสามารถควบคุมการแพร่กระจายของไวรัสได้ในระยะเวลา 3 วัน แสดงให้เห็นว่า IFN- α/β มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัสในช่วงแรกมากกว่า IFN- γ หรือ adaptive immunity ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ho และคณะ (2005) ที่พบว่าการให้ IFN- γ ในช่วงแรกก่อนการติดเชื้อไวรัสเด็งกีของ human Dendritic Cells (DCs) สามารถลดปริมาณไวรัสในเซลล์ได้แต่การให้หลังจาก DCs ติดเชื้อไปแล้วจะไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณไวรัสได้แตกต่างกับการให้ IFN- γ ไม่ว่าจะก่อนหรือหลัง DCs ติดเชื้อก็สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัสได้ และจากการศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อการทำงานของ IFNs ยังพบว่า การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ สามารถยับยั้งขบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tyrosine ในโปรตีน STAT1 และ STAT3 ได้ด้วยการลดการแสดงออกของ Tyk2 ซึ่งเป็นโมเลกุลต้นทางของการกระตุ้นโปรตีน STAT ที่เกิดจากการกระตุ้นผ่านทาง IFN- α แต่ไม่เกิดกับการกระตุ้นผ่านทาง IFN- γ ส่วนผลของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อ IFN- β นั้น Monoz-Jordan และคณะ (2003) พบว่าใน human cell line ที่มีโปรตีนจากไวรัสเด็งกีส่วน Nonstructural 4B (NS4B) จะทำให้ไวรัสที่ไวต่อ IFN มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและต้าน IFN- β ได้โดยลดการทำงานของโปรโมเตอร์ ISRE 54 และ ISRE 9-27 ซึ่งเป็น IFN- β stimulating gene และอาจจะยับยั้งขบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tyrosine ในโปรตีน STAT1 ได้อีกด้วย การศึกษาความสามารถของไวรัสในการต่อต้านการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการค้นหาระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทในการกำจัดไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพยังเป็นสิ่งที่น่าจะศึกษาต่อไปเพื่อนำไปสู่การป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty R.P, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. J Virol 2004; 78: 2701-10.
2. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN- α but not IFN- γ antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. J Immunol 2005; 174: 8163-72.
3. Monoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 14333-8.

นำเสนอโดย : นางสาวดวงจันทร์ สุวรรณแสน

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กาญจนา เลิศมีมงคลชัย

Immunogenicity of ESAT-6 and Ag85b proteins leading to the development of TB vaccine

ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโปรตีน ESAT-6 และ Ag85b นำไปสู่การพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรค

Mycobacterium tuberculosis สามารถขับโปรตีนระหว่างการเจริญเติบโตได้หลายชนิด ที่สำคัญและพบมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ คือ โปรตีน ESAT-6 และ Ag85b ดังนั้นจึงมีการนำโปรตีนดังกล่าวมาศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคกันมากขึ้นเพื่อทดแทนวัคซีน BCG ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันวัณโรคปอด และพบว่า BCG strain ไม่สามารถสร้างโปรตีน ESAT-6 และ Ag85b ได้ การเข้าใจถึงกลไก และบทบาทการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่สำคัญของเชื้อวัณโรค นับว่ามีความสำคัญและจำเป็นยิ่งสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีประสิทธิภาพ Majlessi และคณะ (2005) สนใจที่จะศึกษากลไกและบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโปรตีน ESAT-6 ของเชื้อวัณโรคซึ่งสามารถขับออกมาได้โดยอาศัย Region of difference 1 (RD1) โดยศึกษาในหนู (C57BL/6 mice) ที่ติดเชื้อทางการหายใจด้วยเชื้อ 3 ชนิดคือ BCG ที่ไม่มี RD1 (BCG::pYUB412), BCG ที่มี RD1 รวมอยู่ด้วย (BCG::RD1) และ เชื้อวัณโรค (H37Rv) แล้วนำมาเปรียบเทียบความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายเชื้อ และการเกิดพยาธิสภาพ ซึ่งรวมถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมารวมตัวกันและทำหน้าที่ได้ ผลการศึกษาพบว่า หนูในกลุ่มที่ติดเชื้อ BCG::RD1 ให้ผลการศึกษาที่คล้ายกับหนูที่ติดเชื้อ H37Rv ทั้งทางด้านความรุนแรงของโรค ความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อจากปอดสู่ม้าม และการเกิดพยาธิสภาพที่ปอดโดยพบลักษณะเป็นก้อนเกิดขึ้น (granuloma lesion) รวมถึงความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ทั้งในระบบ innate immunity และ adaptive immunity ให้มารวมตัวกันและทำหน้าที่ได้ เช่นการหลั่ง IFN- γ การแสดงออกของโมเลกุลต่างๆที่สำคัญในการสร้างสารที่จำเป็นในการเกิดการอักเสบ เป็นต้น ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับหนูที่ติดเชื้อ BCG แสดงให้เห็นว่า RD1 สามารถเพิ่มความรุนแรงและเพิ่มความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ BCG ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tully และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าปอดของผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคแต่ไม่แสดงอาการนั้น มี T cells เป็นจำนวนมาก และสามารถสร้าง IFN- γ ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนของเชื้อวัณโรค รวมถึง ESAT-6 และ Ag85b อีกทั้ง Langermans และคณะ (2005) พบว่าการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน Ag85B-ESAT-6 และ challenge ด้วยเชื้อวัณโรค พบว่าสามารถลดการเกิดพยาธิสภาพที่ปอดได้ และพบมีการสร้าง IFN- γ ในระดับที่สูงกว่าลิงที่ไม่ถูกฉีดด้วยวัคซีนดังกล่าว จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าโปรตีน ESAT-6 และ Ag85b สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ทั้งการเพิ่มจำนวน และการสร้าง IFN- γ ได้ดี ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าในอนาคตจะมีการนำโปรตีนดังกล่าวมาผลิตเป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Majlessi L, Brodin P, Brosch R, et al. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between Mycobacteria and the host immune system. *J Immunol* 2005; 174: 3570-9.
2. Tully G, Kortsik C, Hohn H, et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2005; 174: 2174-84.
3. Langermans JAM, Doherty TM, Vervenne RAW, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005; 23: 2740-50.

นำเสนอโดย : นางวิภาวี แสนวงษา

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กาญจนา เลิศมีมงคลชัย

Population genetics of Hb Constant Spring and Hb Pakse' พันธุศาสตร์เชิงประชากรของฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงและฮีโมโกลบินปากเซ

ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb ConSp) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน $\alpha 2$ -globin ที่ตำแหน่งโคดอนยูดี เปลี่ยนจาก TAA \rightarrow CAA ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโกลบินที่มีกรดอะมิโนมากกว่าปกติ และมีเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ไม่เสถียร ผู้ที่เป็นพาหะของยีนดังกล่าวจะไม่แสดงอาการทางคลินิก ส่วนภาวะโฮโมไซโกต Hb ConSp จะพบว่าซีดและตีบม้ามโตได้เล็กน้อย ซึ่งผู้ที่มียีน Hb ConSp ร่วมกับ α -thalassemia 1 จะก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H) แบบ nondeletional ที่มีอาการรุนแรงกว่าแบบ deletional ต่อมาได้มีรายงานการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งที่คล้ายกับ Hb ConSp ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน $\alpha 2$ -globin ที่ตำแหน่งโคดอนยูดีเช่นกัน โดยเปลี่ยนจาก TAA \rightarrow TAT มีชื่อว่าฮีโมโกลบินปากเซ (Hb Pakse') ซึ่งเมื่อพบร่วมกับ α -thalassemia 1 สามารถก่อให้เกิดโรค Hb H ได้เช่นเดียวกัน โดยมีรายงานพบครั้งแรกในคนลาวจากเมืองปากเซและต่อมามีรายงานพบในคนไทย และคนเขมร โดยมีการศึกษาความชุกของ Hb Pakse' ในประชากรไทยอีสาน ลาวหลวงพระบาง และเขมร จำนวนอย่างละ 100 ตัวอย่าง พบความชุกของ Hb Pakse' ในประชากรไทยอีสานและเขมรร้อยละ 2 แต่ไม่พบในลาวหลวงพระบางซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของประเทศลาว แสดงให้เห็นว่าแหล่งกำเนิดของ Hb Pakse' น่าจะอยู่บริเวณรอยต่อของไทย ลาว และกัมพูชา ส่วน Hb ConSp มีรายงานพบบ่อยในประเทศจีนและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่ง Laig M. และคณะได้ทำการศึกษาความชุกของ Hb ConSp ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยศึกษาในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย กัมพูชา และแคว้นอัสสัมประเทศอินเดีย พบว่า กลุ่มประชากรเชียงใหม่, ตาก, ขอนแก่น, อุบลราชธานี รวมทั้งชาวไทยโซ่ และชาวกัมพูชา มีความถี่ยีน Hb ConSp 0.0331, 0.0156, 0.0588, 0.0556, 0.1316 และ 0.0088 ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบในชาวอินเดีย แสดงให้เห็นว่า Hb ConSp มีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบ Hb ConSp ในกลุ่มประชากรอื่นอีกด้วย ได้แก่ กรีก, เมดิเตอร์เรเนียน, อิตาลี และกลุ่มประเทศในตะวันออกกลาง โดย Hartevelde CL. และคณะ ได้ศึกษาถึงแหล่งกำเนิดของ Hb ConSp โดยทำการวิเคราะห์ α -globin gene haplotypes ของ Hb ConSp ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชาวกรีก, ชาวซิซิลี ซึ่งอยู่ในกลุ่มประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน และชาวจีน ด้วยวิธี southern blot พบว่า รูปแบบแฮพลไทป์ของผู้ป่วยชาวกรีกเหมือนกับชาวซิซิลี แต่แตกต่างจากชาวจีน แสดงให้เห็นว่าแหล่งกำเนิดของการกลายพันธุ์ของ Hb ConSp ที่พบในเมดิเตอร์เรเนียนไม่ใช่ที่เดียวกับจีน สำหรับในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษารูปแบบ α -globin gene haplotypes มาก่อน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อย้อนรอยแหล่งกำเนิดของ Hb ConSp และ Pakse' ที่พบในคนไทยและเพื่อนบ้านใกล้เคียง เช่นลาวและเขมรซึ่งจะเป็นข้อมูลพันธุศาสตร์เชิงประชากรสำหรับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Panyasai S, Devenish R, Luy L. Interaction of hemoglobin E and several form of α -thalassemia in Cambodian family. *Haematologica* 2003; 88: 1092-8.
2. Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, Ragusa A, Fichera M, Kanavakis E, Kattamis C, Giordano P, Schiliro G, Bernini LF. Different geographic origins of Hb Constant Spring [α 2 codon 142 TAA \rightarrow CAA]. *Haematologica* 2001; 86(1): 36-8.
3. Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G, Sanguansermisri T, Das BM, Deka R, Yongvanit P, Mularlee N. The distribution of the Hb Constant Spring gene in Southeast Asian populations. *Hum Genet* 1990; 84: 188-90.

นำเสนอโดย : นางสาวसानิตา สิงห์สนั่น
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. กุลนภา พู่เจริญ

High-level expression of AmpC β -lactamase in Gram-negative bacteria due to either nucleotide insertion of promoter or formation of novel promoter elements
การสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ในปริมาณที่สูงขึ้นของแบคทีเรียแกรมลบ เป็นผลจากการแทรกของนิวคลีโอไทด์ใน promoter หรือการเกิด promoter ใหม่

ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียประสบปัญหาอย่างมาก เนื่องจากพบอัตราการดื้อยาของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเพิ่มขึ้น รวมถึงการดื้อต่อยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporins (ESCs) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม β -lactams ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae กลไกหลักในการดื้อต่อยากลุ่ม ESCs คือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ β -lactamases ได้แก่ Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) และ AmpC β -lactamases เอนไซม์เหล่านี้สามารถสลายยาทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้ โดยธรรมชาติเอนไซม์ AmpC β -lactamases พบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* โดยยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์นี้พบอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียและต้องอาศัยตัวกระตุ้น (inducer) เช่น ยา cefoxitin และ imipenem ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ ampC, ampR, ampD และ ampG ใน *Escherichia coli* พบว่ามียีน ampC บนโครโมโซมเช่นกันแต่มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ ต่อมาพบว่า *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณที่สูง รวมทั้งการพบยีน ampC บนพลาสมิดของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยากลุ่ม ESCs ด้วย จากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ampC บนพลาสมิดพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน chromosomal ampC แสดงว่าน่าจะมีการเคลื่อนย้ายยีนนี้ไปยังพลาสมิด อย่างไรก็ตามการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamases ในแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ได้อาศัยตัวกระตุ้นและการควบคุมจาก ampR ดังที่พบในยีน chromosomal ampC แสดงว่าน่าจะมียีนอื่นที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาของ Sui และคณะ (2003) พบว่าการแทรก (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง -10 และ -35 promoter sequences ใน *E. coli* มีผลทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamases เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม ESCs และจากการศึกษาของ Reisbig และคณะ (2004) พบว่ายีน bla_{MIR-1} ซึ่งเป็น non-inducible plasmid-associated ampC มี promoter ใหม่ ซึ่งน่าจะเกิดจากการเคลื่อนย้ายยีน bla_{MIR-1} จากโครโมโซมไปยังพลาสมิด และเกิดการสร้าง hybrid promoter ขึ้นใหม่ ทำให้มีการแสดงออกของยีน ampC เพิ่มขึ้น เป็นผลให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม ESCs จากการศึกษาผลของ promoter sequences ที่มีต่อการแสดงออกของยีนช่วยอธิบายถึงสมมติฐานและกลไกของ non-inducible ampC genes ในการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamases และนำไปสู่การศึกษาการกลไกการสร้างเอนไซม์นี้ในยีนอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Bennet PM, Chopra I. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 153-8.
2. Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal molecule for β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the Anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2113-20.
3. Sui LK, Lu PL, Chen JY, Lin FM, Chang SC. High-level of AmpC β -lactamase due to insertion of nucleotide between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2138-44.
4. Reisbig MD, Hanson ND. Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated ampC β -lactamase gene blaMIR-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4177-82.

นำเสนอโดย : นายสุพจน์ สิงห์โตหิน

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อรุณวดี ชนะวงศ์

HFE mutation and iron status in thalassemia การกลายพันธุ์ของ HFE ยีนกับสถานภาพเหล็กในธาลัสซีเมีย

HFE gene ถูกค้นพบเมื่อ ค.ศ. 1996 มีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมการดูดซึมเหล็กในร่างกาย โดยพบว่า HFE mutation นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค Hereditary hemochromatosis (HH) โดยเฉพาะ C282Y mutation ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่าภาวะ homozygote ของมิวเตชันนี้ สามารถทำให้เกิดโรค HH ได้นอกจากนี้ยังมีรายงานพบ H63D mutation ในผู้ป่วย HH บางราย และยังมีรายงานพบ IVS5 +1 G→A mutation ในเอเชียรวมถึงประเทศไทย โดยพบว่าภาวะ homozygote ของ mutation นี้สามารถทำให้เกิดโรค HH สำหรับในโรคธาลัสซีเมียนั้นมีโอกาสที่จะเกิดภาวะเหล็กเกินได้ง่าย โดยเฉพาะในผู้ป่วย β -thalassemia major ที่ต้องได้รับการให้เลือดตลอดชีวิต จะทำให้มีการดูดซึมเหล็กเพิ่มขึ้น ทำให้เหล็กไปสะสมตามอวัยวะต่างๆเพิ่มขึ้น เกิดเป็นภาวะเหล็กเกิน นอกจากนี้ในผู้ป่วย β -thalassemia intermedia และ minor ยังพบว่าระดับ iron loading จะมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย จึงเชื่อกันว่า การมี HFE mutation ร่วม น่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้ iron loading แตกต่างกัน และทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Ree และคณะ (1997) ได้รายงานถึงภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยโรค β -thalassemia intermedia ร่วมกับการพบ heterozygous C282Y อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Cappellini และคณะ (1998) พบว่าการพบ C282Y heterozygote ในผู้ป่วย β -thalassemia intermedia นั้นไม่ทำให้เกิดภาวะ iron overload แต่การพบ C282Y homozygote ในผู้ป่วย β -thalassemia intermedia นั้นสามารถนำไปสู่ภาวะ iron overload ที่รุนแรงได้ และจากการศึกษาของ Borgna-Pignatti และคณะ (1998) พบว่าการมี HFE mutation ไม่มีผลต่อระดับความรุนแรงของภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วย β -thalassemia major ที่ได้รับเลือดและยาขับเหล็กเป็นประจำ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Anguilar-Martinez และคณะ (2000) ซึ่งพบว่าการมี heterozygote ของ HFE mutation ทั้ง C282Y หรือ H63D ในผู้ป่วย β -thalassemia intermedia หรือ major นั้นไม่ทำให้มี iron loading เพิ่มขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่าภาวะภาวะ homozygous ของ C282Y mutation จะเป็นปัจจัยตัวหนึ่งที่ทำให้อาการของผู้ป่วย β -thalassemia รุนแรงขึ้น นอกจากการศึกษาในผู้ป่วยโรค β -thalassemia แล้วยังมีการศึกษาถึงสถานภาพเหล็กและระดับ ferritin ในผู้ที่ป่วยเป็นพาหะ β -thalassemia ด้วย โดย Malis M และคณะ (2002) พบว่าในพาหะ β -thalassemia ร่วมกับการมี homozygous H63D นั้นมีระดับ ferritin สูงกว่าพาหะ β -thalassemia ที่ไม่มี HFE mutation และจากการศึกษาของ Jazayeri และคณะ (2003) พบว่าในพาหะ β -thalassemia ที่มี HFE mutation แบบ heterozygote นั้นมีระดับ ferritin ที่ไม่แตกต่างจากพาหะ β -thalassemia ที่ไม่มี HFE mutation สำหรับในประเทศไทยนั้น Viprakasit และคณะ (2004) ได้ศึกษา HFE mutation ในผู้ที่เป็น homozygous Hb E พบว่า heterozygous H63D นั้นไม่มีผลต่อระดับ ferritin และ iron loading ในผู้ที่เป็น homozygous Hb E ดังนั้นจากการศึกษาต่างๆ จึงสามารถกล่าวได้ว่า การมี HFE mutation แบบ heterozygote นั้นไม่มีผลต่อ iron loading แต่อย่างใด แต่การมี homozygous C282Y ร่วมกับ β -thalassemia นั้น จะทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อการพัฒนาเป็น iron overload เพิ่มขึ้น และทำให้มีอาการทางคลินิกรุนแรงขึ้นด้วย



เอกสารอ้างอิง

1. Rees Dc, Luo LY, Then SL, Singh BM, Wickramasinghe S. Non -tansfusional iron overload in thalassemia: association with hereditary hemochromatosis. Blood 1997; 90: 3234-6.
2. Cappellini MD, Fargion SR, Sampietro M, Graziadei G, Fiorelli G. Non transfusional iron overload in thalssemia intermedia: role of the hemochromatosis allele. Blood 19998; 92: 4479-89.
3. Borgna-Pignatti C, Solinas A, Bombieri C, et al. The haemochromatosis mutations do not modify the clinical picture of thalassemia major in patients regularly transfused and chelated. Br J Haematol 1998; 103: 813-6.
4. Aguilar-Martinez P, Schved JF, Fischer R, Piga A, Camaschella C. Iron overload in thalassemia and genetic haemochromatosis. Eur J Haematol 2000; 64: 279-80.
5. Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cao A, Galanello R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. Haematologica 2002; 87: 242-5.
6. Jazayeri M, Bakayev V, Adibi P, et al. Frequency of HFE gene mutations in Iranian beta-thalassemia minor pateints. Eur J Haematol 2003; 71: 408-11.
7. Viprakasit V, Vathesathokit P, Chinchang W, et al. Prevalence of HFE mutations among the Thai population and correlation with iron loading in haemoglobin. Eur J Haematol 2004; 73: 43-9.

นำเสนอโดย : นางสาวสุภาวดี แยมศรี
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กนกวรรณ แสนไชยสุริยา